

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA  
LUCIANA WESTPHAL

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS REATIVOS POR  
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

LUCIANA WESTPHAL

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS REATIVOS POR  
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Bacharelado em Química Tecnológica do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Campus Curitiba, como requisito para obtenção de título de Bacharel e Licenciado em Química Tecnológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselle Maria Maciel.

CURITIBA

2015

**LUCIANA WESTPHAL**

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS REATIVOS POR  
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso **aprovado** como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1 – Profa. Dra. Valma Martins Barbosa**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Membro 2 – Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Orientadora – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel**  
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler**

Curitiba, 03 de dezembro de 2015.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Claudio e Yoshiko Westphal, pelo carinho e apoio que me deram nesta longa jornada, principalmente à minha mãe por todo incentivo e interesse prestado em todas as longas horas no laboratório durante meu TCC. Aos meus avós, Amélia e Yoshiaki Yanagita, por todos os dias em que me fizeram almoço com tanto carinho e tantos lanchinhos para 'sobreviver' às tardes no laboratório. À minha sogra, Maria Salete Tramontim, que tantas vezes me incentivou a continuar estudando e me dedicando. A minha orientadora, Giselle Maria Maciel, por todos os ensinamentos que me passou, apoio, carinho e paciência que teve comigo durante esses 2 anos trabalhando juntas. Aos amigos Debora Biasi, Ludmila Holz, Marcia M. Wambier e Henrique Ruiz que tantas vezes me ajudaram nos trabalhos e nos estudos. À instituição por todo o auxílio prestado. O meu obrigada mais que especial ao meu namorado, Rogerio Carlos Weigert Junior, por me dar todo o suporte e o carinho que precisei durante todo o período de faculdade.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação tanto acadêmica quanto pessoal o meu sincero agradecimento

Obrigada!

## Resumo

WESTPHAL, Luciana. Degradação de corantes reativos por biocatalisadores enzimáticos. Pré-projeto de TCC. Bacharelado e Licenciatura em Química Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

As indústrias têxteis produzem grandes volumes de efluentes, com elevada carga orgânica e coloração. Estima-se que 15-20% do volume de corantes adicionados aos processos sejam descartados como resíduos. Os corantes utilizados pela indústria têxtil apresentam características como a resistência à exposição à luz e a muitos produtos químicos e não perdem a cor facilmente devido a sua estrutura complexa e origem sintética, o que os torna difíceis de serem degradados além de apresentarem natureza tóxica e impactos no ambiente. A aplicação de enzimas como biocatalisadores na degradação de corantes sintéticos é uma alternativa promissora, considerando que é um processo ambientalmente correto, pois enzimas são biodegradáveis, não geram lodo e podem mineralizar vários corantes, e que tem demonstrado ser eficiente em estudos realizados em escala laboratorial em diversas condições. Neste trabalho foram realizados testes de otimização de produção de lacase por cultivo líquido e estático a 28°C do *Trametes sp.* e *Pycnoporus sp.* em cultivo isolado e co-cultivo, utilizando-se como resíduo lignino celulósico a casca de arroz em diferentes massas e granulometrias. Os extratos enzimáticos brutos obtidos foram utilizados na biodegradação dos corantes têxteis Amarelo Reativo HE4R e Preto Reativo 5 em regime estático a  $(40 \pm 2)$  °C em diferentes condições de concentração de corante e atividade enzimática, com e sem a presença do mediador químico ácido 4-hidroxibenzoico em dois meios reacionais (aquoso e tampão de acetato de sódio). A utilização dos extratos enzimáticos mostrou-se eficiente na degradação do corante Preto reativo 5 para diferentes condições analisadas, porém apresentou baixa eficiência na degradação do corante Amarelo Reativo HE4R.

Palavras-chave: Corantes reativos; catálise enzimática; biorremediação; biocatalisadores.

## Abstract

WESTPHAL, Luciana. Degradação de corantes reativos por biocatalisadores enzimáticos. Pré-projeto de TCC. Bacharelado e Licenciatura em Química Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

The textile industries produce large volumes of effluents with high organic charge and staining. It is estimated that 15-20% of the volume of dye added to the processes are discarded as waste. Dyes used for the textile industry have characteristics as resistance to light exposure and to many chemicals and will not discolor easily due to their complex structure and synthetic origin, which makes them difficult to be degraded it also have a toxic nature and impact in the environment. The application of enzymes as biocatalysts in the degradation of synthetic dyes is a promising alternative, considering that it is an environmentally friendly process, because enzymes are biodegradable, do not generate sludge and can mineralize more colorants, and has been shown to be effective in conducted in laboratory scale studies under various conditions. This work carried out laccase production optimization and testing by the liquid static culture at 28 ° C of *Trametes* sp. and *Pycnoporus* sp. in isolated culture and co-cultivation, using as cellulosic lignin residue rice husk in different particule sizes and masses. Crude enzyme extracts obtained were used in biodegradation of textile dyes Yellow Reactive HE4R and Black Reactive 5 in static regime (40 ± 2) ° C at different conditions of dye concentration and enzymatic activity with and without the presence of chemical mediator acid 4-hydroxybenzoic in two reaction media (aqueous and sodium acetate buffer). The use of the enzyme extract was efficient in the degradation of Reactive Black 5 dye for different conditions analyzed, but showed low efficiency in the degradation of the dye Reactive Yellow HE4R.

Keywords: Reactive dyes; enzymatic catalysis; bioremediation; biocatalysts

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. ESTRUTURA DO CORANTE VERMELHO CONGO CONTENDO GRUPOS CROMÓFOROS AZO (A). FONTE: ADAPTADO DE BERGAMINI ET AL, 2005. ....   | 19 |
| FIGURA 2. ESTRUTURA DO CORANTE RB4 CONTENDO GRUPO CROMÓFORO ANTRAQUINONA (B). FONTE: ADAPTADO DE GUARATINI E ZANONI, 2000. ....  | 20 |
| FIGURA 3. EXEMPLO DE INTERAÇÃO COVALENTE ENTRE O GRUPAMENTO REATIVO DO CORANTE E O GRUPAMENTO HIDROXILA DA CELULOSE DA FIBRA. FONTE: ADAPTADO DE GUARATINI E ZANONI, 2000. .   | 21 |
| FIGURA 4. SIMILARIDADES ESTRUTURAIS ENTRE UM SEGMENTO DA MOLÉCULA DE LIGNINA E ALGUNS CORANTES TÊXTEIS. FONTE: ADAPTADO DE NIEBISCH, 2009. ....  | 24 |
| FIGURA 5. PROCESSO DE INOCULAÇÃO DO BASIDIOMA RETIRADO DO ESPÉCIME COLETADO DA NATUREZA ....   | 26 |
| FIGURA 6. FOTOS DOS MEIOS DE CULTURA PREPARADOS COM RESÍDUOS LIGNINOCELULÓSICOS. SENDO A CASCA DE ARROZ EM PÓ; B CASCA DE ARROZ INTEIRA; C BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRITURADO; D BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM PÓ..... | 28 |
| FIGURA 7. PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....   | 29 |
| FIGURA 8. MEIOS DE CULTIVO LÍQUIDO COM SE SEM ADIÇÃO DE CASCA DE ARROZ PREPARADOS PARA REALIZAR A INOCULAÇÃO DOS ESPÉCIMES E OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS. ....   | 30 |
| FIGURA 9. PROCESSO DE FILTRAÇÃO PARA RETENÇÃO GROSSEIRA DE BIOMASSA E OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS. ....  | 31 |
| FIGURA 10. ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE PRETO REATIVO 5. FONTE: CHEMICAL BOOK. ....  | 33 |
| FIGURA 11. ESTRUTURA MOLECULAR DO MEDIADOR QUÍMICO UTILIZADO, O ÁCIDO 4-HIDRÓXIBENZÓICO.....   | 35 |
| FIGURA 12. PROCESSO DE ISOLAMENTO DO FUNGO TRAMETES SP. A PARTIR DE ESPÉCIME COLETADO DA NATUREZA.....   | 36 |
| FIGURA 13. FUNGO TRAMETES SP. ISOLADO EM PDA.....  | 37 |
| FIGURA 14. CRESCIMENTO DO FUNGO PYCNOPORUS SP. INDUZIDO PELA PRESENÇA DE RESÍDUOS LIGNINOCELULÓSICOS NO MEIO DE CULTIVO.....   | 38 |
| FIGURA 15. CRESCIMENTO DOS FUNGOS ANALISADOS EM CASCA DE ARROZ TRITURADA E INTEIRA. SENDO A O FUNGO TRAMETES SP. E B O PYCNOPORUS SP.....  | 39 |
| FIGURA 16. VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÉDIA DE LACASE PRODUZIDA PELOS FUNGOS ESTUDADOS, EM CULTIVO LÍQUIDO, ESTÁTICO A 28°C COM VARIAÇÃO DA GRANULOMETRIA E MASSA DE RESÍDUO LIGNINOCELULÓSICO UTILIZADO.....  | 41 |
| FIGURA 17. VARREDURA DOS CORANTES ANALISADOS DO COMPRIMENTO DE ONDA DE 800 A 350 NM.....   | 42 |
| FIGURA 18. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PRETO REATIVO 5 LINEARIZADA.....   | 43 |
| FIGURA 19. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO AMARELO REATIVO HE4R LINEARIZADA. ....   | 43 |
| FIGURA 20. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO AMARELO REATIVO HE4R EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 50 MM PH 5 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ESTÁTICO A (40 ± 2) °C ..                             | 45 |
| FIGURA 21. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO PRETO REATIVO 5 EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 50MM PH 5 EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ESTÁTICO A (40 ± 2) °C .....                                | 45 |
| FIGURA 22. TUBOS DE CONTROLE E AMOSTRAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE 200U/L DO CORANTE AMARELO REATIVO HE4R EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 50 MM E PH 5 APÓS 24 HORAS EM ESTUFA A (40 ± 2) °C.....                     | 46 |
| FIGURA 23. TUBOS DE CONTROLE E AMOSTRAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE 200U/L DO CORANTE PRETO REATIVO 5 EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 50 MM E PH 5 APÓS 24 HORAS EM ESTUFA A (40 ± 2) °C .....                         | 46 |
| FIGURA 24. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO AMARELO REATIVO HE4R EM SOLUÇÃO AQUOSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ESTÁTICO A (40 ± 2) °C .....   | 47 |
| FIGURA 25. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO PRETO REATIVO 5 EM SOLUÇÃO AQUOSA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ESTÁTICO A (40 ± 2) °C .....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 26. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO CORANTE AMARELO REATIVO HE4R EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO 50MM E PH 5 E PRESENÇA DE MEDIADOR, ESTÁTICO A $(40 \pm 2)$ °C EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA UTILIZADA ..... | 49 |
| FIGURA 27. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DO CORANTE PRETO REATIVO 5 EM TAMPÃO DE ACETATO DE SÓDIO E MEDIADOR, ESTÁTICO A 40°C EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA UTILIZADA.....  | 49 |
| FIGURA 28. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO CORANTE DO AMARELO REATIVO HE4R EM SOLUÇÃO AQUOSA E PRESENÇA DE MEDIADOR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, EM REGIME ESTÁTICO A $(40 \pm 2)$ °C EM 24 HORAS .....             | 51 |
| FIGURA 29. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO CORANTE DO PRETO REATIVO 5 EM SOLUÇÃO AQUOSA E PRESENÇA DE MEDIADOR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA, EM REGIME ESTÁTICO A $(40 \pm 2)$ °C EM 24 HORAS .....                  | 51 |
| FIGURA 30. AMOSTRAS DE CORANTE RETIRADAS EM DIFERENTES TEMPOS PARA INTERRUPÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA .....   | 52 |
| FIGURA 31. DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RETIRADA DAS AMOSTRAS COM AJUSTE EXPONENCIAL DE 3 PARÂMETROS.....  | 53 |
| FIGURA 32. GRÁFICO DOS RESÍDUOS DA CONCENTRAÇÃO PELA VARIÁVEL INDEPENDENTE .....  | 54 |
| FIGURA 33. ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE NA AMOSTRA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE PARA A ADIÇÃO DE 200 U/L DE ENZIMA .....   | 55 |



## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDOS UTILIZANDO-SE COMO VARIÁVEIS O TAMANHO E A QUANTIDADE EM MASSA DE RESÍDUO NO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA O FUNGO TRAMETES SP. ....                | 40 |
| TABELA 2. VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDOS UTILIZANDO-SE COMO VARIÁVEIS O TAMANHO E A QUANTIDADE EM MASSA DE RESÍDUO NO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA O FUNGO PYCNOPORUS SP. ...               | 40 |
| TABELA 3. VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDOS UTILIZANDO-SE COMO VARIÁVEIS O TAMANHO E A QUANTIDADE EM MASSA DE RESÍDUO NO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO PARA O FUNGO TRAMETES SP E PYCNOPORUS SP..... | 40 |

## Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

|      |   |
|------|---|
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) |
| AEM  | Ágar extrato de Malte                                 |
| BHI  | <i>Brain heart infusion</i>                           |
| ELM  | Enzimas lignino modificadoras                         |
| FPB  | Fungos da podridão branca                             |
| Lac  | Enzima Lacase   |
| LiP  | Enzima Lignina Peroxidase                             |
| MnP  | Enzima Manganês Peroxidase                            |
| PCA  | <i>Plate Count Ágar</i>                               |
| PDA  | <i>Potato Dextrose Ágar</i>                           |
| PGA  | <i>Potato Glucose Ágar</i>                            |
| TSA  | <i>Trypticase soy Ágar</i>                            |
| WRF  | <i>White Rot Fungi</i>                                |

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 14        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 14        |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....   | <b>17</b> |
| 4.1 A INDÚSTRIA TÊXTIL E O EFLUENTE GERADO .....   | 17        |
| 4.2 CORANTES TÊXTEIS .....   | 18        |
| 4.3 CORANTES REATIVOS .....  | 20        |
| 4.4 BIORREMEDIAÇÃO .....   | 21        |
| 4.5 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA .....  | 22        |
| 4.6 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS .....   | 23        |
| <b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....   | <b>26</b> |
| 5.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS BASIDIOMICETOS .....                                 | 26        |
| 5.2 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS .....   | 29        |
| 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....   | 31        |
| 5.3.1 <i>Atividade da lacase</i> .....   | 32        |
| 5.3.2 <i>Atividade da Manganês peroxidase</i> .....  | 32        |
| 5.3.3 <i>Atividade da lignina peroxidase (LiP)</i> .....   | 32        |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS ENZIMAS LIGNINO MODIFICADORAS NA BIODEGRADAÇÃO DOS<br>CORANTES ..... | 32        |
| 5.5 EFEITO DOS MEDIADORES QUÍMICOS .....   | 34        |
| <b>6 RESULTADOS</b> .....  | <b>36</b> |
| 6.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS BASIDIOMICETOS .....                                 | 36        |
| 6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....   | 39        |
| 6.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS ENZIMAS LIGNINO MODIFICADORAS NA BIODEGRADAÇÃO DOS<br>CORANTES ..... | 42        |
| 6.4 EFEITO DOS MEDIADORES QUÍMICOS .....   | 48        |
| 6.5 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO .....                          | 52        |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | <b>58</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O setor têxtil representa uma parcela importante na economia mundial devido, principalmente, à grande demanda por produtos fabris coloridos. Como resultado desta procura tem-se a geração de grandes volumes de efluente, que é composto principalmente por banho residual de tingimento e águas de lavagem (Bastian, et al., 2009). Esse efluente possui coloração e carga orgânica elevada e pode ser considerado como um dos tipos mais prejudiciais gerados pela indústria devido ao impacto ambiental causado ao ecossistema dos corpos hídricos (Cisneros R. L. & I., 2002). Outras características relacionadas ao efluente da indústria têxtil são a toxicidade e, em alguns casos, mutagenicidade, tornando-se prejudiciais não apenas ao meio ambiente como também aos seres humanos (Peixoto, et al., 2013).

Entre os diversos tipos de corantes utilizados na indústria têxtil os de maior destaque são os corantes reativos, por serem os mais utilizados em todo o mundo. Os corantes do tipo reativo têm como principal característica a presença de um grupo cromóforo e um grupo reativo em sua estrutura molecular, sendo derivado desta característica o nome desta classe de corantes. São empregados no tingimento de algodão, lã e tecidos de outras fibras celulósicas além de serem altamente solúveis em água (Souza, 2006)

Os corantes têxteis são compostos químicos complexos e de difícil degradação. As técnicas comumente utilizadas para o tratamento do efluente têxtil são baseadas em processos de coagulação e adsorção, porém apresentam baixa eficácia na remoção da cor e redução da toxicidade deste tipo de efluente e podem gerar uma quantidade significativa de lodo (Peixoto, et al., 2013). Não existe uma metodologia que seja universalmente utilizada para o tratamento de efluentes têxteis, isso se deve à grande variedade de estruturas desses compostos. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para degradação de corantes têxteis, entre elas pode-se citar os tratamentos biológicos que apresentam grande potencial de remoção de cor (Guaratini & Zanoni, 2000).

Dos diversos organismos empregados na degradação de corantes têxteis os fungos são os que apresentam maior potencial e podem ser aplicados in vivo ou imobilizados. Os fungos promovem a degradação dos corantes de efluentes têxteis através de 3 mecanismos distintos, sendo estes a bioacumulação, a biossorção e a biodegradação (Gaylarde, et al., 2005).

A biodegradação é um processo que envolve a degradação do corante por via enzimática envolvendo consumo de energia. Quando ocorre a quebra completa da molécula com a produção de água e dióxido de carbono e outros subprodutos inorgânicos tem-se a mineralização. Os chamados fungos da podridão branca (FPB) são basidiomicetos capazes de degradar e mineralizar uma vasta gama de compostos xenobióticos e recalcitrantes devido a seu sistema enzimático oxidativo composto de várias enzimas chamadas de enzimas lignino-modificadoras (Salvi, 2011).

Os FPB possuem um sistema lignolítico extracelular que produz enzimas como a Manganês peroxidase (MnP), Lignina peroxidase (LiP) e Lacase (Lac) que devido à sua baixa especificidade estão envolvidas na degradação de vários compostos xenobióticos como corantes, pesticidas, bifenilclorados (BPCs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (Peixoto, et al., 2013).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade de enzimas ligninolíticas, de diferentes espécies de fungos basidiomicetos, como biocatalisadores para a degradação de 2 diferentes corantes têxteis do tipo reativos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e selecionar fungos basidiomicetos, em técnicas de cultivo líquido estático e submerso, para a produção e aplicação de enzimas ligninolíticas na degradação de corantes têxteis do tipo reativos;
- Testar a influência da presença de mediadores redox no processo enzimático de biodegradação dos corantes;
- Avaliar a eficiência da degradação de corantes sintéticos do tipo reativos pelos biocatalisadores enzimáticos produzidos em escala laboratorial.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os problemas ambientais podem ser gerados em ar, água ou solo, sendo a contaminação da água uma das maiores preocupações, principalmente quando ocorre a contaminação de fontes de água doce e reservas do lençol freático. O setor têxtil possui grandes parques industriais instalados por todo o mundo, gerando grandes volumes de efluente que se não forem devidamente tratados antes de serem liberados nos corpos hídricos podem ocasionar problemas de contaminação ambiental de grandes proporções.

Para proteger o meio ambiente e a saúde da população tem sido criadas Leis e Normas mais rigorosas quanto ao descarte de efluente que tenha potencial para causar problemas ambientais. Exigindo-se que as empresas se responsabilizem por tratar adequadamente o efluente gerado para que seja liberado após tratamento adequado. Tendo em vista o aumento do rigor nas legislações pode-se citar o projeto de Lei nº 333, de 2012, aprovado em julho de 2013, determina a classificação dos corantes como contaminantes ambientais. Este projeto de Lei, que foi aprovado na Assembleia Legislativa e está aguardando sanção do governador, proíbe o lançamento de efluentes que contenham corante, em rios, lagos, represas e demais corpos de água doce do Estado de São Paulo. No estado do Paraná ainda não há uma legislação específica quanto ao descarte deste tipo de efluentes, porém a necessidade de tratar adequadamente a água vem crescendo gradativamente.

Efluentes contendo corantes são considerados os mais prejudiciais ao ecossistema aquático, pois a cor resultante afeta a transmissão de luz dentro da coluna d'água causando modificações no equilíbrio do ecossistema, além disso, a presença de compostos recalcitrantes pode ocasionar doenças, mutações genéticas e ter efeitos tóxicos, não somente à fauna e a flora, mas também aos seres humanos.

Considerando as dimensões do problema faz-se necessário ressaltar também que os corantes têxteis são projetados para que sejam resistentes à luz, temperatura, água, detergentes, produtos químicos, sabão e outros parâmetros, tais como água sanitária e transpiração. O tempo de meia vida do corante hidrolisado Azul Reativo 19 é de 46 anos a pH 7 e 25°C, por exemplo.

Os tratamentos utilizados atualmente pela indústria têxtil são fundamentados nas técnicas de coagulação e floculação, que apresentam elevada remoção do material particulado, no entanto a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos é deficiente. Em vista de todos esses fatores novas formas de tratamento têm sido desenvolvidas para a remoção dos corantes, entre essas técnicas encontram-se os tratamentos biológicos e o uso de enzimas para biocatalisar reações de degradação, no processo chamado de bioremediação. As vantagens potenciais dos processos enzimáticos sobre os tratamentos convencionais são: a aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, a ausência da necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil controle de processo (Durán & Esposito, 2000).



## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 A INDÚSTRIA TÊXTIL E O EFLUENTE GERADO

A indústria têxtil é um importante setor da economia, apresentando um alto crescimento nos últimos anos. No entanto, como consequência desse aumento, efluentes industriais potencialmente tóxicos também são gerados em quantidades elevadas, sendo assim um potencial contribuinte à degradação do meio-ambiente (Zollinger, 1987). A implementação de leis e normas ambientais cada vez mais restritivas e a criação de mercados mais competitivos vêm exigindo que as empresas sejam mais eficientes do ponto de vista produtivo e ambiental (CETESB e SindiTêxtil, 2009). Segundo dados do Instituto de Estudos e Marketing Industrial (IEMI), no ano de 2010 o maior produtor de têxteis foi a China com uma produção de 38.561 mil toneladas, que representa 50,7% da produção mundial enquanto que o setor têxtil brasileiro ocupa o quinto lugar, com uma produção de 2.249 mil toneladas. As águas residuárias coloridas provenientes da indústria têxtil são consideradas como as mais poluídas entre todos os setores industriais e mais de 100.000 diferentes corantes e pigmentos têxteis são utilizados em comum em todo o mundo (Robinson, et al., 2001). A produção total de corantes no mundo é estimada em 800.000 ton/ano (Ganodermaieri, et al., 2005) e 26.500 t somente no Brasil (Guaratini & Zanoni, 2000).

As indústrias têxteis consomem grandes volumes de água e produtos químicos no processamento úmido de tecidos (Banat, et al., 1999). É estimado que pelo menos 10-15% dos corantes têxteis são perdidos durante o processo de tingimento e que de 2-20% destes são diretamente descarregados como efluente aquoso em diferentes compartimentos ambientais (Jin, et al., 2007). Os efluentes têxteis caracterizam-se por serem altamente coloridos, devido à presença de corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento (Kunz, et al., 2001). No corpo hídrico a cor interfere na transmissão da luz solar para dentro da corrente de água e, prejudica a atividade fotossintética das plantas presentes nesse ecossistema. Além disso, a oxidação biológica desse material consome o oxigênio dissolvido existente, prejudicando a atividade respiratória dos organismos vivos e, em consequência, causa o aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (Silvera & Santanna, 1990). A remoção de

corantes de efluentes industriais é uma tarefa complexa, porque, em geral, eles são estáveis e de difícil degradação.

As técnicas de tratamento utilizadas atualmente baseiam-se em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação. O sistema apresenta uma eficiência relativamente alta, permitindo a remoção de aproximadamente 80% da carga de corantes, infelizmente, o problema relacionado com o acúmulo de lodo torna-se crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento (Kunz, et al., 2001). Esses processos em geral são caros e possuem eficiência limitada além de gerarem um resíduo que também necessita de tratamento (Peixoto, et al., 2013). Devido estes fatores, novas tecnologias têm sido buscadas para a degradação ou imobilização destes compostos em efluentes têxteis que sejam mais eficientes e de baixo custo. Numerosos processos têm sido propostos para o tratamento de efluentes coloridos como precipitação, floculação, coagulação, adsorção e oxidação (Robinson, et al., 2001). Assim sendo, tem crescido o interesse por processos biotecnológicos que visem diminuir o alto custo do tratamento destes efluentes e que sejam realmente eficientes (Khelifi, et al., 2008).

#### 4.2 CORANTES TÊXTEIS

A tecnologia moderna no tingimento consiste de dúzias de etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras (Zollinger, 1987). Muitos corantes são de difícil remoção devido à sua estrutura complexa e origem sintética (Robinson, et al., 2001). De modo geral os corantes utilizados na indústria têxtil são projetados para ser resistentes ao desbotamento pela exposição à luz, suor, água, produtos químicos, incluindo muitos agentes oxidantes, e ataque microbiano (Wesenberg, et al., 2003). Por exemplo, estudos mostram que o tempo de meia vida do corante hidrolisado Azul Reativo 19 é de 46 anos a pH 7 e 25°C (Chequer, et al., 2013)

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra (Kunz, et al., 2001). A forma de fixação da molécula do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes (Guaratini & Zanoni, 2000).

A classificação dos corantes pode se dar pelo tipo de fibra ao qual é designado, pelos métodos de aplicação no substrato ou de acordo com a sua estrutura química. Os principais grupos de corantes classificados pelo modo de fixação são os corantes reativos, diretos, azoicos, ácidos, corantes à cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (Guaratini & Zanoni, 2000). Dentre eles, destacam-se os corantes reativos que são os mais utilizados em nível mundial e assim chamados devido a sua capacidade de formarem ligações covalentes com a fibra (Kunz, et al., 2001). Os principais tipos de corantes reativos contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos (Figuras 1 e Figura 2) e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (Guaratini & Zanoni, 2000).

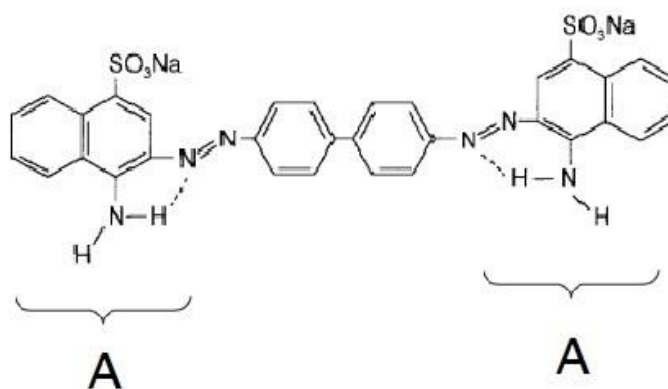


Figura 1. Estrutura do corante Vermelho congo contendo grupos cromóforos azo (A). Fonte: Adaptado de Bergamini et al, 2005.

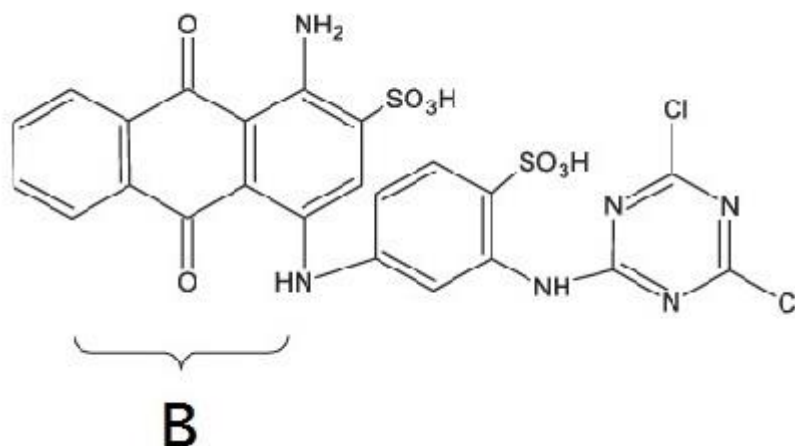


Figura 2. Estrutura do corante RB4 contendo grupo cromóforo antraquinona (B). Fonte: Adaptado de Guaratini e Zanoni, 2000.

#### 4.3 CORANTES REATIVOS

São corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas (Figura 2), com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas e também com grupos amino das poliamidas (Guaratini & Zanoni, 2000). Nesta classe de corantes, a interação com a fibra é feita através de uma ligação covalente onde o grupo nucleofílico do corante é substituído pelo grupo hidroxila da celulose (Souza, 2006), a figura 3 apresenta um exemplo desta interação.

Existe uma grande variedade de tipos de corantes reativos, entretanto aqueles que possuem como grupos cromóforos às funções azo e antraquinona e como grupos reativos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila são os principais representantes (Fleck, 2011).

Este grupo de corantes apresenta como característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido, quando comparado a outros tipos de corante em que o processo de coloração se opera através de ligações de maior intensidade (Cerqueira, 2006).

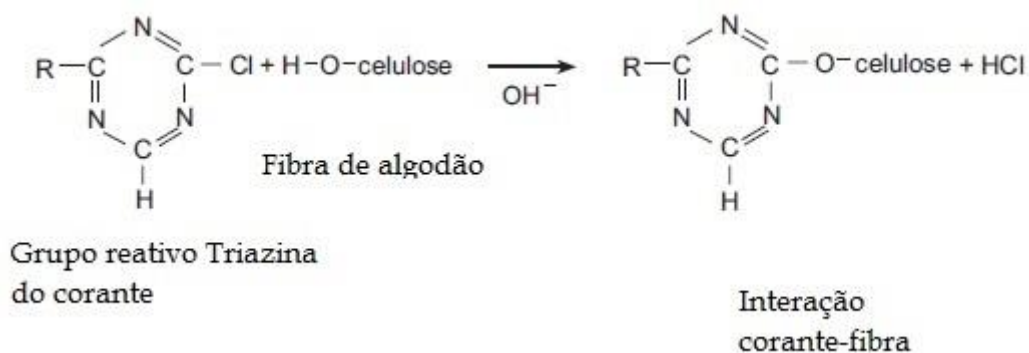


Figura 3. Exemplo de interação covalente entre o grupamento reativo do corante e o grupamento hidroxila da celulose da fibra. Fonte: Adaptado de Guaratini e Zanoni, 2000.

#### 4.4 BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação é o uso de organismos vivos em tratamento de ambiente contaminado para reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (Salvi, 2011); (Kumar, et al., 2011). Os compostos contaminantes são transformados por estes organismos vivos devido a reações que ocorre como uma parte de seu processo metabólico (Kumar, et al., 2011).

Os processos biológicos de descontaminação enquadrados na categoria de bioremediação utilizam organismos autóctones (do próprio ambiente) ou alóctones (introduzidos no ambiente, em estado nativo ou geneticamente modificados) com a capacidade de degradar xenobióticos, resultando em produtos de degradação com estrutura menos recalcitrante em relação à molécula original, ou na mineralização do xenobióticos, produzindo compostos químicos simples (Castellani, 1939) (Gaylarde, et al., 2005). Processos otimizados podem ser conduzidos no próprio local (in situ), ou fora dele (ex situ), implicando assim na remoção do material contaminado (Boopathy, 2000).

Os fatores que influenciam na velocidade de degradação (acelerando ou reduzindo) são:

- Físicos: A natureza física da matriz onde o composto é encontrado (solo, água, ar), temperatura e luz.

- Químicos: Composição química da matriz ambiental que define a capacidade nutritiva, pH, umidade, teor de oxigênio dissolvido, potencial redox do meio, composição e estrutura química, presença de metais pesados e a presença de outros xenobióticos.
- Biológicos: Presença de populações de microrganismos e co-metabolismo (ocorre quando o composto é apenas parcialmente degradado, por uma ou mais enzimas de uma rota catabólica sem que o produto resultante contribua para a sobrevivência do micro-organismo) (Gaylarde, et al., 2005).

#### 4.5 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA

Em geral, os fungos que decompõem substâncias lignocelulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos possuem importante função de reciclagem de nutrientes (Filho, 2008). Os fungos basidiomicetos são incluídos taxonomicamente no Filo Basidiomycota do Reino Fungi. Morfologicamente são caracterizados como fungos que produzem esporos de origem sexuada em estruturas especializadas chamadas basídios, onde ocorre a cariogamia e a meiose (Salvi, 2011). Os basidiomicetos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes na natureza, principalmente no ciclo do carbono, na medida em que são excelentes degradadores de lignina, o segundo biopolímero mais abundante sobre a terra. Também contribuem para a manutenção do ciclo de outros elementos como nitrogênio, fósforo e potássio, incorporados aos componentes insolúveis das paredes celulares (Carlile & Watkinson, 1996).

Fungos que degradam madeira são classificados em três grupos: fungos da podridão branca (FPB) (do inglês white rot fungi – WRF), que são capazes de degradar todos os componentes da madeira; fungos da podridão parda ou marrom, que degradam preferencialmente os polissacarídeos; fungos da podridão suave, que degradam a lignina e os polissacarídeos, mas de maneira bem mais lenta do que os outros (Durán & Esposito, 2000); (Melo & Azevedo, 2008). Os basidiomicetos de degradação branca são caracterizados pela habilidade de degradar polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina é um polímero aromático da parede celular

vegetal que proporciona rigidez à célula, impermeabilidade, resistência microbiana e possui uma biodegradabilidade restrita (Filho, 2008). Apesar de vários dos seus aspectos ainda necessitarem de investigação, a degradação da lignina por fungos basidiomicetos pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoreduções (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular.

Inicialmente pensava-se que a capacidade dos basidiomicetos em degradar compostos xenobióticos devia-se a semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e as moléculas de alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os compostos aromáticos. Atualmente sabe-se que a capacidade biodegradativa de fungos de podridão branca deve-se a presença do sistema enzimático ligninolítico inespecífico, extracelular e de alto poder oxidante (Pointing, 2000); (Salvi, 2011). Pode-se afirmar que a classe de microrganismos mais eficiente em degradar corantes sintéticos são os fungos da podridão branca, que possuem alta capacidade de despolimerização e mineralização aeróbica de lignina. Sendo esta propriedade baseada na capacidade dos fungos de degradação branca de produzirem uma ou mais enzima lignino-modificadora extracelularmente, que devido à sua falta de especificidade de substrato são capazes de degradar uma vasta quantidade de xenobióticos (Wesenberg, et al., 2003).

#### 4.6 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As chamadas enzimas lignino-modificadoras ou modificadoras de lignina (do inglês lignin-modifying enzymes – LME) são representadas principalmente pela manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e pela lacase (Lac). Este grupo compõe as principais enzimas responsáveis pela degradação de lignina em seu ambiente natural assim como de uma vasta variedade de

Compostos xenobióticos (Pointing, 2000). Alguns dos fungos da podridão branca produzem estas 3 enzimas, enquanto que outros produzem apenas uma ou duas delas (Hatakka, 1994). As enzimas lignino-modificadoras são essenciais na

degradação de lignina, entretanto na mineralização geralmente há o envolvimento de enzimas adicionais, conhecidas como enzimas auxiliares (Wesenberg, et al., 2003). Estas enzimas auxiliares (por si só não são capazes de degradar lignina) são glicoxal oxidase e superóxido desmutase para a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um co-substrato para a LiP e para a MnP, assim como a glicose oxidase, aril álcool oxidase e celobiose desidrogenase envolvidos em circuitos de retroalimentação e ligando a degradação da lignina com a degradação da celulose e da hemicelulose na natureza (Leonowicz, et al., 1999) ;(Wesenberg, et al., 2003).

A base da não especificidade das enzimas modificadoras de lignina encontra-se na formação de radicais livres, muito reativos, passíveis de interações com múltiplos substratos. A degradação da lignina, bem como xenobióticos recalcitrantes, é um processo complexo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação que envolve numerosos co-fatores de baixa massa molar, os quais podem servir como mediadores de óxido-redução (Niebisch, 2009). Isso permite a degradação de vários xenobióticos com similaridades estruturais com a lignina (Domingues, 2009) (Figura 4).

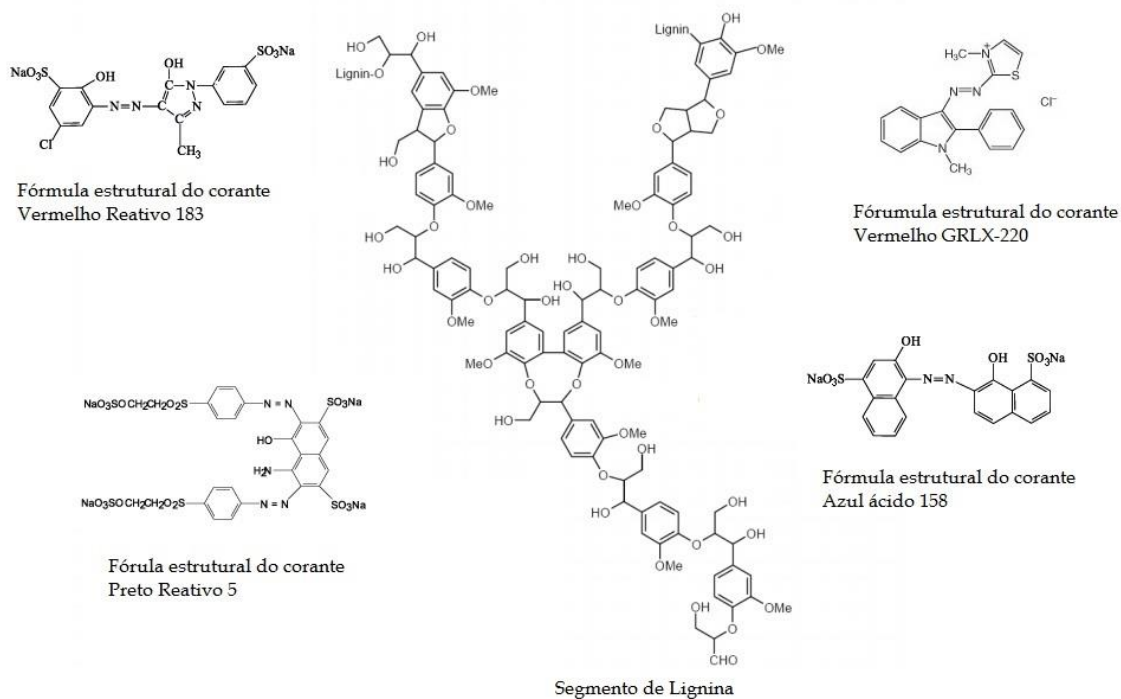


Figura 4. Similaridades estruturais entre um segmento da molécula de lignina e alguns corantes têxteis. Fonte: Adaptado de NIEBISCH, 2009.



Wesenberg et al. (Wesenberg, et al., 2003) lista uma série, mais ou menos geral, de considerações que podem ser feitas acerca do uso de fungos da podridão branca para bioremediação de compostos recalcitrantes:

- As ELM produzidas pelos fungos da podridão branca são produzidas durante seu metabolismo secundário já que a oxidação da lignina não fornece energia líquida para o fungo;
- A síntese e secreção dessas enzimas é frequentemente induzida por níveis limitados de nutrientes (maioritariamente de carbono e nitrogênio);
- A produção de LiP e MnP é geralmente otimizada com alta tensão de oxigênio, mas é reprimida com agitação de cultura líquida de WRF submersa, enquanto que a produção de Lac é frequentemente reforçada por agitação;
- Frequentemente mais de uma isoforma das ELM são expressas por diferentes condições de taxa e cultura.

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Isolamento, seleção e manutenção dos fungos basidiomicetos

O isolamento dos espécimes de fungos basidiomicetos foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) após coleta de basidiomas de *Pycnoporus sp.* e *Trametes sp.* de madeira em decomposição, encontrados na região de Curitiba – Pr. O processo foi iniciado com a limpeza física das amostras, lavando os basidiomas em solução de água deionizada e hipoclorito de sódio 0,01% e então enxaguado em água deionizada e seco para retirada do excesso de água residual. Uma parte do micélio fungico foi retirada com auxílio do bisturi e inoculado em placas de Petri de 90 mm contendo 30 mL de meio de cultivo PDA autoclavados a 121°C e 1,1 psi (procedimento padrão de esterilização), como apresentado na figura 5. As placas foram então incubadas em estufa a 28°C por um período de 7 dias, para que então fosse refeito o plaqueamento, retirando da Placa de Petri original uma parte do micélio do espécime de interesse, evitando a transferência de contaminações. Este procedimento foi repetido até que a cepa estivesse completamente isolada (cultura axênica).

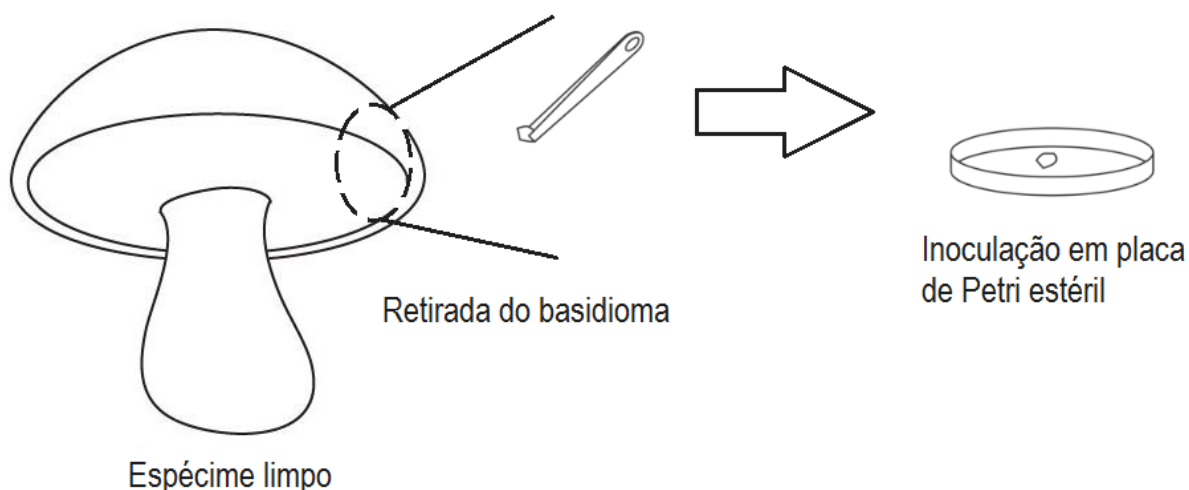


Figura 5. Processo de inoculação do basidioma retirado do espécime coletado da natureza

Durante o período de estudo foi observada uma redução gradativa na atividade metabólica do fungo *Pycnoporus sp.* que ocasionou dificuldades no cultivo e manutenção do fungo. Para sanar este problema foram feitos experimentos utilizando-

se outros meios de cultivo para o repique. Todos os meios testados foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados. Os meios de cultivo foram preparados em placas de Petri de 90 mm contendo 30 mL do meio de cultivo analisado, sendo estes listados abaixo:

- PCA (Plate Count Ágar)
- AEM (Ágar extrato de Malte)
- PDA com Caldo BHI (brain heart infusion)
- TSA (*trypticase soy agar*)
- Ágar Nutriente
- PGA (Potato Glucose Ágar)

Também foram testados os meios de cultivo PDA, PGA e PCA preparados nas mesmas condições da análise anteriormente citada, contendo resíduos lignocelulósicos. Os resíduos foram testados em quantidades de 0,5, 1,5 e 2,5 g. Foram avaliados dois tipos de resíduos, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, em diferentes granulometrias (triturados e inteiros). A Figura 6 apresenta os meios de cultivo preparados contendo resíduos lignocelulósicos.

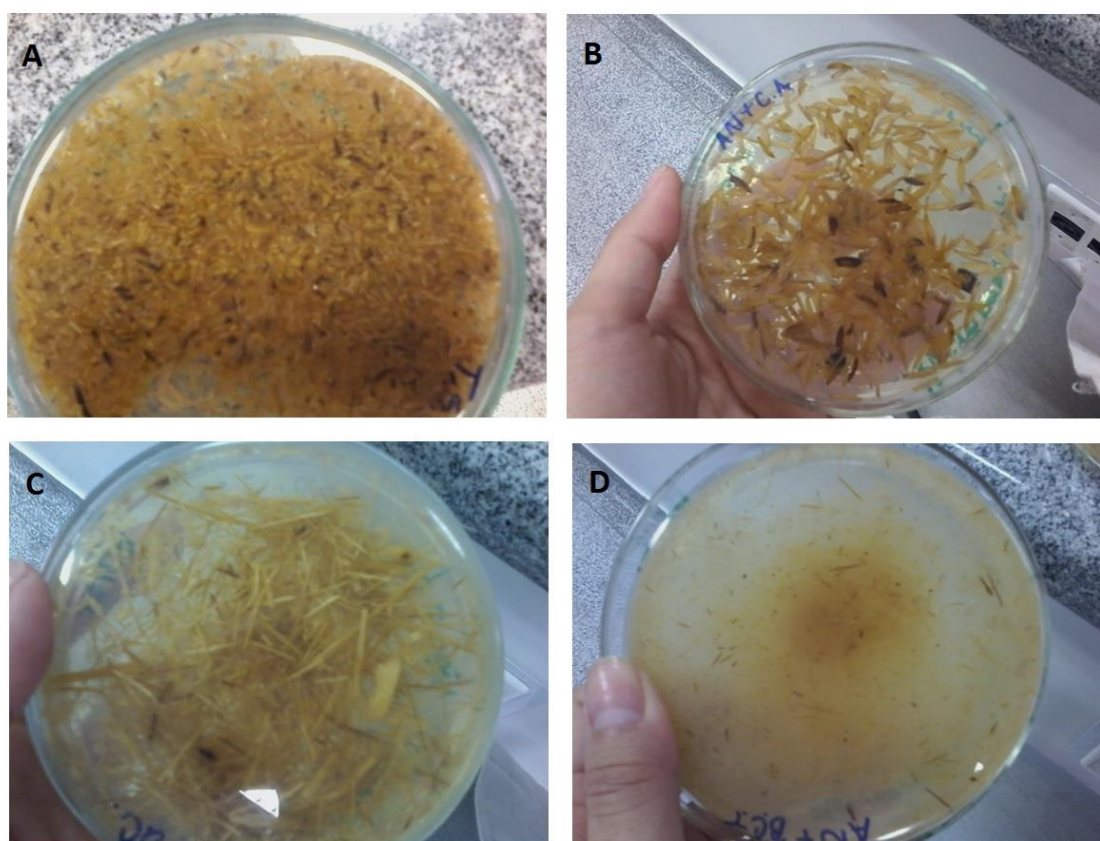


Figura 6. Fotos dos meios de cultura preparados com resíduos lignocelulósicos. Sendo A casca de arroz em pó; B casca de arroz inteira; C Bagaço de cana-de-açúcar triturado; D bagaço de cana-de-açúcar em pó

Foi avaliado também a viabilidade de utilização dos resíduos como meio de cultivo para os fungos. Estes meios de cultivo foram preparados contendo resíduos lignocelulósicos, em diferentes granulometrias, e solução aquosa de glicose 10 g/L para umedecer o meio e servir como nutriente para os espécimes inoculados. Estes meios de cultivo foram preparados em erlenmeyers de 100 mL, contendo massas de 1, 3 e 5g de casca de arroz, esterilizados e então inoculados com 2 *plugs* de ágar de 3 mm de diâmetro, contendo o fungo de interesse. Os erlenmeyers foram colocados em estufa por 7 dias a 28°C e os meios foram umidificados a cada 2 dias com 1 mL da solução de glicose previamente esterilizada.

A metodologia de preservação escolhida foi o método de Castellani (Castellani, 1939) (Rodrigues, et al., 1992), que consiste na preservação do fungo em água deionizada estéril. Foram colocados 15 mL de água deionizada em frascos de vidro transparentes com tampa de borracha, esterilizados. A inoculação foi realizada com 5

*plugs* de ágar de 3 mm contendo o fungo a ser preservado. Os recipientes foram vedados e mantidos em temperatura ambiente e local iluminado, após um período de 3 meses foi realizado uma análise para verificar a integridade do espécime. Um plug de ágar retirado do frasco de preservação foi inoculado em placa de Petri esteril contendo meio de cultivo PDA, e incubado por 7 dias a 28°C. Um segundo teste com Castellani foi feito utilizando a mesma metodologia de preparo, porém a estocagem foi realizada em refrigeração, a 4°C. Após 3 meses o mesmo procedimento foi feito para análise de viabilidade e crescimento do espécime.

## 5.2 Produção e extração das enzimas ligninolíticas

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada por cultivo líquido estático em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto por glicose (10 g/L), fosfato de potássio monobásico (3 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (1,5 g/L) e peptona (0,5 g/L). A produção de enzimas ligninolíticas foi avaliada na presença e ausência de casca de arroz no meio de cultivo, em diferentes granulometrias e massas. A figura 7 apresenta o procedimento de produção dos extratos enzimáticos.

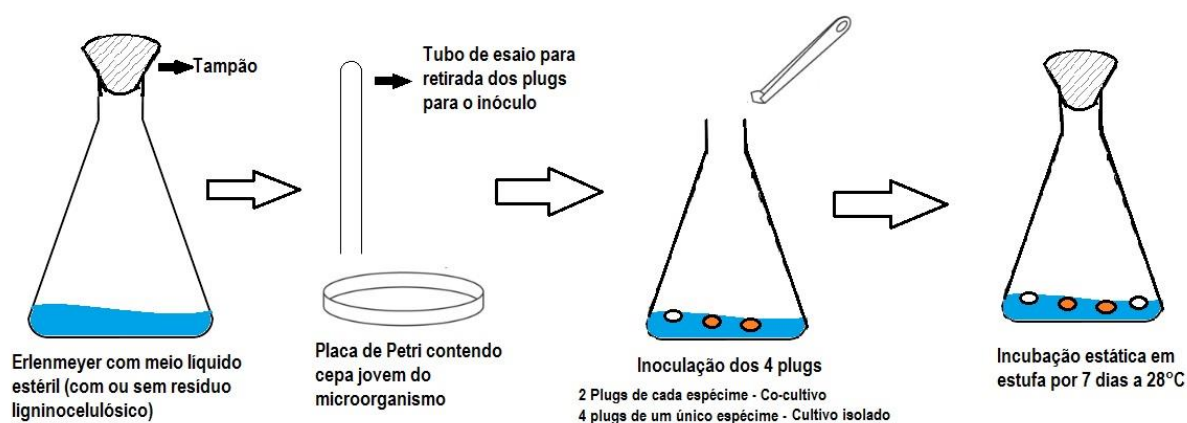


Figura 7. Procedimento de produção dos extratos enzimáticos

Realizou-se testes de produção dos extratos enzimáticos com e sem resíduo de casca de arroz e este em diferentes granulometrias e massas, sendo estas nas quantidades de 0,5g, 1,0g, 1,5g, 2,0g, 2,5g e 3,0g, como mostrado na figura 8. Os

meios de cultivo foram autoclavados em procedimento padrão de esterilização e inoculados com 4 *plugs* de ágar contendo o micélio dos fungos analisados. Analisou-se a produção de enzimas lignocelulósicas nos extratos com o cultivo isolado do fungo (*Trametes* sp. e *Pycnoporus* sp.) e com co-cultivo dos fungos (*Trametes* sp. e *Pycnoporus* sp.). NA inoculação do cultivo isolado utilizou-se 4 *plugs* do fungo de interesse e no co-cultivo foram utilizados 2 *plugs* de cada um dos fungos. Os erlenmeyer foram então colocados em estufa a 28°C por 7 dias. Ao fim deste período a biomassa e os resíduos foram separados por filtração utilizando papel filtro qualitativo como apresentado na figura 9. O filtrado foi então centrifugado a 3.400 rpm, por 30 minutos utilizando-se centrífuga QUIMIS, para melhorar a separação da biomassa. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto.

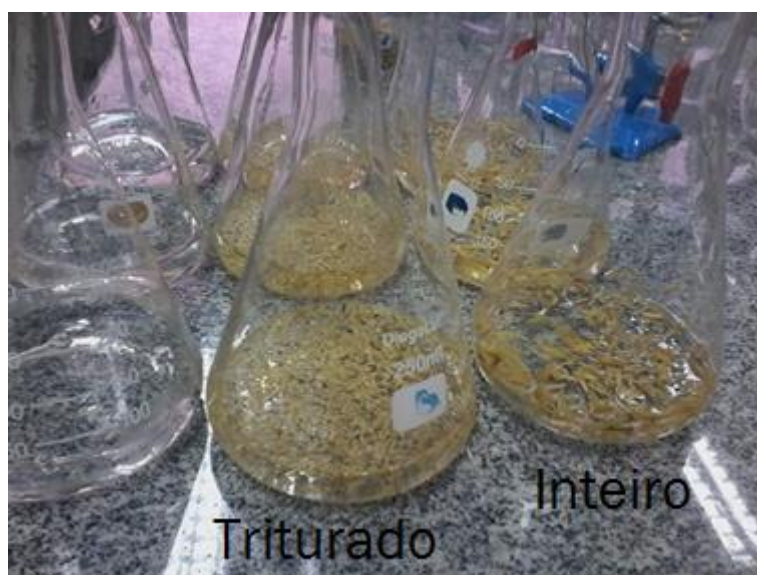


Figura 8. Meios de cultivo líquido com se sem adição de casca de arroz preparados para realizar a inoculação dos espécimes e obtenção de extratos enzimáticos brutos.



Figura 9. Processo de filtração para retenção grosseira de biomassa e obtenção de extratos enzimáticos brutos.

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada variando-se as seguintes condições para otimização na produção das enzimas lignino-modificadoras:

- Tipo de fungo utilizado
- Cultivo isolado e co-cultivo
- Quantidade de resíduos presentes
- Granulometria do resíduo

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A quantificação da atividade enzimática foi realizada através dos ensaios de atividade da lacase (Lac), atividade da manganês peroxidase (MnP) e da atividade da lignina peroxidase (LiP).



### 5.3.1 Atividade da lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada utilizando-se espectrofotômetro no comprimento de onda fixo de 420 nm, através do monitoramento da oxidação do 2,2'-azino-bis (3-etiltiazolina-6-sulfonato) (Hou, et al., 2004)

### 5.3.2 Atividade da Manganês peroxidase

Atividade enzima manganês peroxidase (MnP) foi avaliada pela oxidação do  $\text{MnSO}_4$  1 mM em solução tamponada em pH 4,5 com o tampão malonato de sódio 0,05 M e, na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Wariishi, et al., 1992).

### 5.3.3 Atividade da lignina peroxidase (LiP)

O monitoramento da atividade da lignina peroxidase foi feito por medidas de absorvância utilizando um comprimento de onda igual a 310 nm, da oxidação do álcool veratrílico em tampão tartarato 0,1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , a pH 3 e, na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kirk, et al., 1984).

## 5.4 Avaliação da eficiência das enzimas lignino modificadoras na biodegradação dos corantes

As características de cada um dos corantes utilizados nas análises de biodegradação são apresentados abaixo:

- Amarelo reativo HE4R: Fornecido pela empresa QUIMISA, tem como sinônimos os nomes “Reactive Yellow 84” e “Reactive Yellow KE-4R”, possui massa molar de 1.823,11  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e fórmula molecular  $\text{C}_{57}\text{H}_{38}\text{I}_2\text{N}_{14}\text{Na}_6\text{O}_{20}\text{S}_6$ . O número de registro CAS é 61951-85-7. A estrutura molecular do corante não pode ser obtida nem com a empresa responsável pela doação do reagente.
- Preto reativo 5: Fornecido pela empresa Sigma Aldrich, tem como sinônimo os nomes Dimi-raBlackB, Adizol Black B, Remazol Black B, e Begazol Black B, possui massa molecular de 991,82  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e fórmula molecular



C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>19</sub>S<sub>6</sub>. O número de registro CAS é 17095-24-8. A estrutura molecular do corante Preto Reativo 5 é mostrada na figura 10.

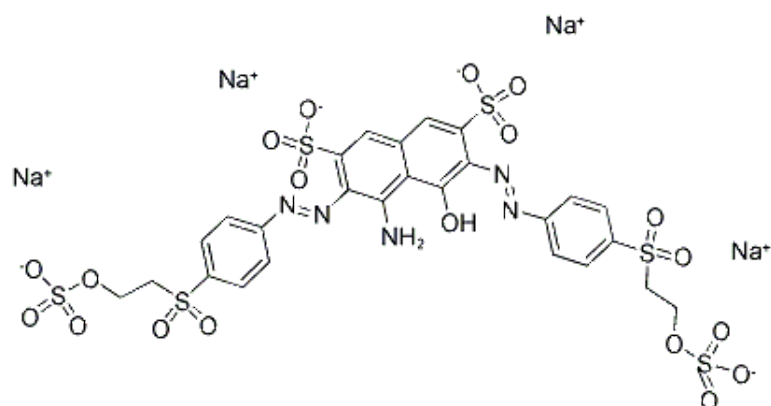


Figura 10. Estrutura molecular do corante Preto reativo 5. Fonte: Chemical Book.

A determinação do pico de absorção dos corantes avaliados foi realizada por espectrofotometria de varredura de 350 – 700 nm utilizando espectrofotômetro BEL, de uma solução aquosa de 30 mgL<sup>-1</sup> do corante em água deionizada.

Para verificar a eficiência das enzimas lignino-modificadoras na degradação dos corantes têxteis foi feito um comparativo entre a quantidade de corante inicialmente encontrada na amostra e após o tratamento enzimático, segundo a equação 1:

$$\eta = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} * 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde Abs<sub>i</sub> é a absorbância inicial observada na amostra e Abs<sub>f</sub> é a absorbância final da amostra, após o tratamento enzimático aplicado.

Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando-se um tubo controle contendo todos os reagentes, exceto os extratos enzimático que foram substituídos por água deionizada, e um tubo de branco, contendo o mesmo volume utilizado de enzima e água deionizada para substituir os demais reagentes (corantes, tampão, mediador). Para eliminação de turbidez gerada pela presença de biomassa residual ou formação de precipitados de proteína, todas as amostras foram transferidas para ependorfs e centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm.

Para determinação da quantidade final de corante presente nas soluções pós teste foi preparada uma curva de calibração relativa à cada um dos corantes, para que se pudesse converter absorbância em mg/L de corante em solução.

Como cada extrato enzimático bruto obtido possui uma atividade enzimática distinta, foi realizada uma padronização do teste de degradação. Em cada tubo de ensaio foi adicionado um volume de fixo de corante e um volume adequado de extrato enzimático, calculado para cada extrato, contendo atividade enzimática pré-determinada.

Foram avaliadas as condições de degradação em estufa a  $(40 \pm 2)$  °C em meio estático para as seguintes condições:

- Presença de tampão de acetato de sódio 50mM pH 5
- Água deionizada
- Diferentes concentrações de atividade enzimática
- Diferentes concentrações de corante

Para averiguar o deslocamento do pico realizou-se uma varredura espectrofotométrica na amostra pós tratamento para verificação do deslocamento das bandas de absorção no mesmo comprimento de onda avaliado anteriormente.

Uma análise utilizando a enzima desnaturada pelo calor foi realizada para verificar se a degradação do corante foi em função das enzimas ou algum metabólito presente no extrato enzimático bruto.

## 5.5 Efeito dos mediadores químicos

Estudos comprovaram que a presença de alguns compostos, chamados mediadores químicos, afetam, de forma positiva, a eficácia de enzimas lignino modificadoras em degradar compostos xenobióticos (Wesenberg, et al., 2003) (Robinson, et al., 2001) (Asgher, et al., 2008).

Neste estudo foi avaliado a influência de um mediador químico na degradação dos corantes analisados, sendo este o Ácido 4-hidroxibenzóico. Foram realizadas análises contendo o corante e o mediador com as seguintes variáveis:

- Presença de tampão de acetato de sódio 50mM e pH5
- Água deionizada
- Diferentes concentrações de atividade enzimática
- Diferentes concentrações de corante

O mediador químico avaliado neste estudo foi o Ácido 4-hidroxi benzoico, um isômero do ácido salicílico, de número de registro CAS 99-96-7, que tem peso molecular de  $138,12\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , tem como fórmula molecular  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ . A figura 11 apresenta a estrutura molecular do Ácido 4-hidroxi benzoico.

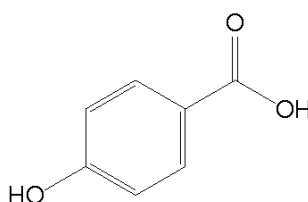


Figura 11. Estrutura molecular do mediador químico utilizado, o ácido 4-hidroxi benzoico

Para todas as análises contendo o mediador utilizou-se 1 mL de solução  $0,01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido 4-hidroxi benzoico.

## 5.6 Avaliação da degradação e atividade enzimática em função do tempo

Para avaliar o tempo necessário ao início da degradação e a taxa de remoção do corante foi escolhida a melhor condição alcançada na degradação no período de 24 horas para o corante que apresentou melhor descoloração. A análise foi realizada utilizando-se os tempos de 0 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 24 horas. Estas mesmas análises foram repetidas para avaliar a atividade enzimática nestes pontos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Isolamento, seleção e manutenção dos fungos basidiomicetos

O isolamento dos espécimes coletados da natureza ocorreu de forma bem-sucedida, obtendo culturas axênicas, com bom crescimento radial no período de incubação de 7 dias. Este curto período de crescimento é fundamental para que o estudo possa ser desenvolvido no período disponibilizado. As figuras 12 e 13 apresentam o fungo *Trametes* sp. em processo de isolamento, utilizando-se um pedaço do basidioma fungico para o plaqueamento e o fungo já isolado, respectivamente.

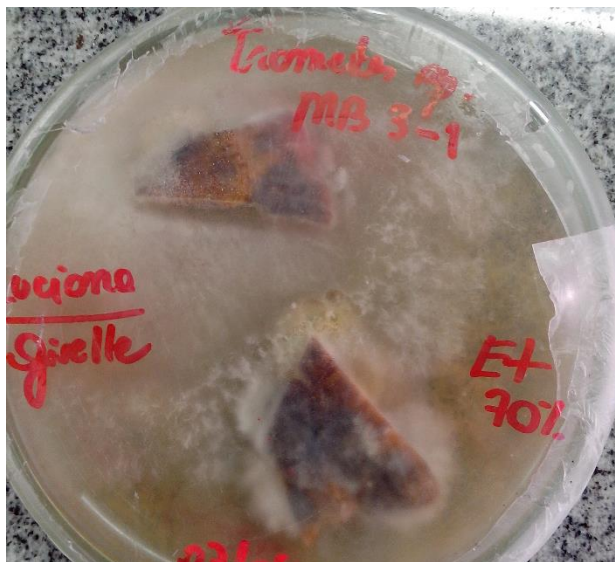


Figura 12. Processo de isolamento do fungo *Trametes* sp. a partir de espécime coletado da natureza



Figura 13. Fungo *Trametes sp.* isolado em PDA

Após o início dos estudos de produção dos extratos enzimáticos o fungo *Pycnoporus sp.* apresentou uma redução na atividade metabólica, afetando seu crescimento e impossibilitando a utilização dele nos experimentos. Este problema pode ter ocorrido tanto por estresse causado pela mudança de ambiente como por falta de nutrientes similares aos encontrados em seu habitat natural.

Como não houve êxito nos testes de crescimento em diferentes meios de cultivo realizou-se uma nova batelada de testes utilizando-se os resíduos ligninocelulósicos juntamente com os meios de cultivo sólido. Não foram obtidos resultados de crescimento fungico para o meio de cultivo PCA contendo os diferentes resíduos agroindustriais nas diferentes quantidades analisadas. Quanto aos meios de cultivo PGA e PDA notou-se que não houve preferência do espécime por nenhum dos resíduos analisados. Com exceção dos testes realizados com 0,5g de resíduo em que praticamente não houve crescimento radial, todas as demais quantidades avaliadas dos diferentes resíduos promoveram o desenvolvimento do fungo. A Figura 14 apresenta o fungo *Pycnoporus sp.* com crescimento induzido pela presença do resíduo ligninocelulósico no meio de cultivo.



Figura 14. Crescimento do fungo *Pycnoporus* sp. induzido pela presença de resíduos ligninocelulósicos no meio de cultivo

Com estes testes pode-se concluir que o fungo *Pycnoporus* sp teve um melhor desenvolvimento em meio de cultivo não seletivo apropriado para fungo (PDA ou PGA) contendo resíduos ligninocelulósicos em quantidades de no mínimo 1,5 g de resíduo para 30 mL de meio de cultivo. Tendo observado esta necessidade do micro-organismo de obter nutrientes próprios de seu habitat natural foi testado o crescimento destes em resíduos ligninocelulósicos para armazenamento do espécime, visando reduzir os custos com a compra de meios de cultivo e o estresse causado no fungo, assim como otimizar a disponibilidade de nutrientes necessários para o crescimento. A figura 15 apresenta o desenvolvimento dos fungos no resíduo avaliado contendo 5,0 g de resíduo.

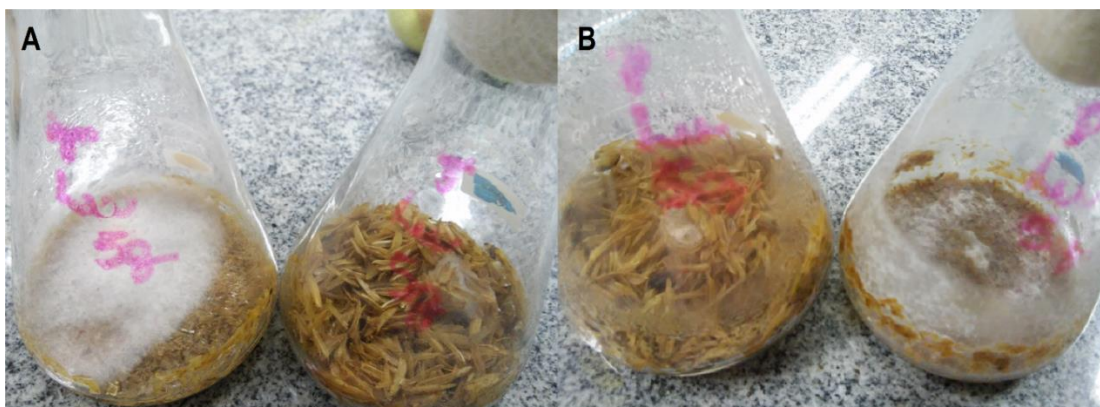


Figura 15. Crescimento dos fungos analisados em casca de arroz triturada e inteira. Sendo A o fungo *Trametes sp.* e B o *Pycnoporus sp.*

Durante estas análises notou-se o desenvolvimento mais rápido de ambos os fungos no resíduo de menor granulometria no período de 7 dias, porém no período de 1 mês de incubação pode-se verificar o crescimento do fungo *Pycnoporus sp.* com coloração laranja mais acentuada no resíduo de maior granulometria. A inoculação dos fungos da figura 13 foram realizadas no mesmo dia, o que ilustra a diferença nas velocidades de desenvolvimento.

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de três enzimas linino-modificadoras foi determinada espectrofotometricamente nos extratos brutos obtidos após os experimentos de cultivo dos fungos. Somente a atividade da enzima lacase foi encontrada nos extratos enzimáticos, e não foram detectados valores significativos de MnP e LiP.

Como já era esperado a presença de resíduos lignocelulósicos no meio de cultivo induziu a produção da enzima lacase nos FPB (Elisashvili, et al., 2008). Estudos feitos por Kachlishvili (Kachlishvili, et al., 2006), constataram que o tipo e a composição do substrato lignocelulósico determina o tipo e a concentração de enzimas produzidas por fungos da podridão branca. Devido a isso foram feitos testes para analisar a influência da quantidade de resíduo presente no meio de cultivo e a relação com o aumento na produção de Lac nos extratos enzimáticos. A tabela 1 apresenta os valores mínimo, máximo, médio e o desvio padrão de atividade da enzima lacase em

relação à quantidade de resíduo presente no meio de cultivo durante o crescimento do fungo *Trametes sp.* A Tabela 2 apresenta os mesmos resultados obtidos para o fungo *Pycnoporus sp.* e a tabela 3 para o co-cultivo destes.

Tabela 1. Valores de atividade enzimática obtidos utilizando-se como variáveis o tamanho e a quantidade em massa de resíduo no meio de cultivo líquido para o fungo *Trametes sp.*

|  | <b>Atividade média (U/L)</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|--|------------------------------|----------------------|
| <i>Sem casca de arroz</i>              | 151,98                       | 67,66                |
| <i>Com casca de arroz (0,5g)</i>       | 331,65                       | 60,59                |
| <i>Com casca de arroz (1g)</i>         | 321,22                       | 48,39                |
| <i>Com casca de arroz (1,5g)</i>       | 299,59                       | 63,81                |
| <i>Com casca de arroz (2g)</i>         | 313,24                       | 38,28                |
| <i>Com casca de arroz (2,5g)</i>       | 350,59                       | 39,48                |
| <i>Com casca de arroz (3g)</i>         | 384,00                       | 31,16                |
| <i>Casca de arroz triturada (0,5g)</i> | 380,04                       | 38,45                |
| <i>Casca de arroz triturada (1g)</i>   | 345,54                       | 51,36                |
| <i>Casca de arroz triturada (1,5g)</i> | 335,55                       | 62,66                |
| <i>Casca de arroz triturada (2,0g)</i> | 399,27                       | 45,48                |
| <i>Casca de arroz triturada (2,5g)</i> | 351,59                       | 39,32                |
| <i>Casca de arroz triturada (3g)</i>   | 373,68                       | 41,36                |

Tabela 2. Valores de atividade enzimática obtidos utilizando-se como variáveis o tamanho e a quantidade em massa de resíduo no meio de cultivo líquido para o fungo *Pycnoporus sp.*

|                                 | <b>Atividade média (U/L)</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>Sem casca de arroz</i>       | 196,31                       | 28,32                |
| <i>Com casca de arroz</i>       | 342,91                       | 61,99                |
| <i>Casca de arroz triturada</i> | 684,15                       | 19,87                |

Tabela 3. Valores de atividade enzimática obtidos utilizando-se como variáveis o tamanho e a quantidade em massa de resíduo no meio de cultivo líquido para o co-cultivo dos fungos *Trametes sp* e *Pycnoporus sp.*

|                                  | <b>Atividade média (U/L)</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>Sem casca de arroz</i>        | 201,45                       | 40,71                |
| <i>Com casca de arroz</i>        | 803,39                       | 75,66                |
| <i>Com casca de arroz (1,5g)</i> | 649,68                       | 30,14                |
| <i>Com casca de arroz (2g)</i>   | 669,89                       | 45,23                |
| <i>Casca de arroz triturada</i>  | 544,33                       | 58,71                |



O menor número de parâmetros de análise utilizados para o cultivo isolado do fungo *Pycnoporus sp.* e no co-cultivo do *Pycnoporus sp.* e *Trametes sp.* foi devido aos problemas de manutenção do fungo apresentados anteriormente, não restando tempo viável para estas análises após recuperação do espécime. A figura 16 apresenta a variação da atividade enzimática média de Lacase produzida no cultivo dos fungos isolados e no co-cultivo destes utilizando-se meio de cultivo líquido em condição estática a 28°C no período de 7 dias de incubação, com variação da quantidade e granulometria do resíduo ligninocelulósico utilizado no estudo.

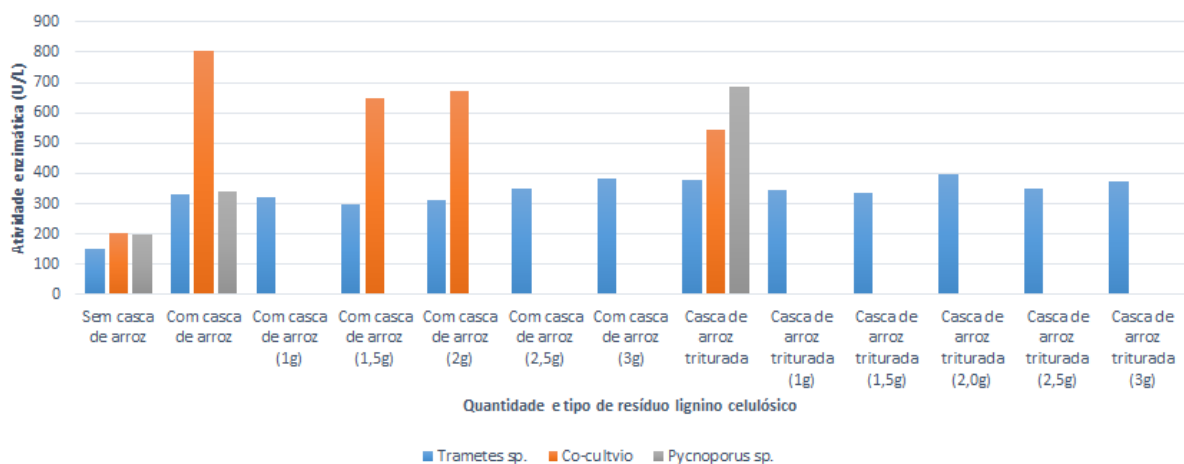


Figura 16. Variação da atividade enzimática média de Lacase produzida pelos fungos estudados, em cultivo líquido, estático a 28°C com variação da granulometria e massa de resíduo ligninocelulósico utilizado

Analisando os valores de atividade enzimática média de Lacase dos dois fungos isolados e do co-cultivo desses, verifica-se que a presença do resíduo dobrou os valores obtidos, porém a presença de quantidades de resíduo superiores a 0,5g não tiveram grande influência na produção de lacase, principalmente para o fungo *Trametes sp.* em que estes valores se mantiveram praticamente constantes. No cultivo isolado do fungo *Pycnoporus sp.* utilizando o resíduo de menor granulometria foram obtidos valores mais elevados de atividade enzimática quando comparado ao cultivo isolado do outro microrganismo. Como verificado por Kachlishvili em estudos feitos com diversos FPB em diversos tipos de resíduo lignino celulósicos a indução de produção da Lacase está intimamente relacionada com a preferência do microrganismo às características do resíduo utilizado. Sendo assim pode-se afirmar

que o fungo *Pycnoporus* sp teve melhor adaptação ao resíduo casca de arroz quando comparado ao *Trametes* sp. A granulometria do resíduo também foi um fator de grande influência para o microrganismo, sendo que o aumento da área superficial da casca de arroz afetou positivamente a produção enzimática, dobrando os valores de atividade de lac obtidos.

O maior valor de atividade enzimática média foi obtido no co-cultivo. Estudos utilizando esta estratégia de indução de produção de enzimas lignino-modificadoras tem mostrado resultados promissores para a produção de lacase. O mecanismo de funcionamento da indução na produção de enzimas durante o co-cultivo ainda é desconhecido (Chi, et al., 2007) (Elisashvili, et al., 2008). O sinergismo entre as vias metabólicas das cepas de microrganismos utilizados afetou positivamente a produção da Lacase no estudo, sendo uma provável causa a competição por nutrientes gerado pela presença de outro micro-organismo que utiliza os mesmos substratos para o crescimento.

### 6.3. Avaliação da eficiência das enzimas lignino modificadoras na biodegradação dos corantes

O primeiro teste realizado foi a varredura espectrofotométrica dos corantes avaliados de do comprimento de onda de 350 a 800 nm apresentado na figura 17.

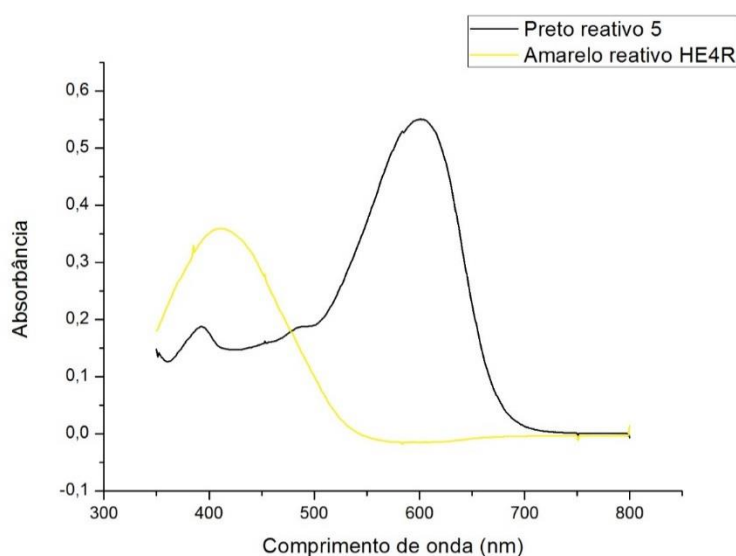


Figura 17. Varredura dos corantes analisados do comprimento de onda de 800 a 350 nm

Usando esses dados foi verificado que o pico máximo de absorção do corante Preto Reativo 5 é 594 nm e o do corante Amarelo Reativo HE4R é de 409 nm. As curvas de calibração foram feitas com base nos comprimentos de onda determinados. As figuras 18 e 19 apresentam as curvas de calibração utilizadas, assim como os valores de R<sup>2</sup> e da equação da reta obtida.

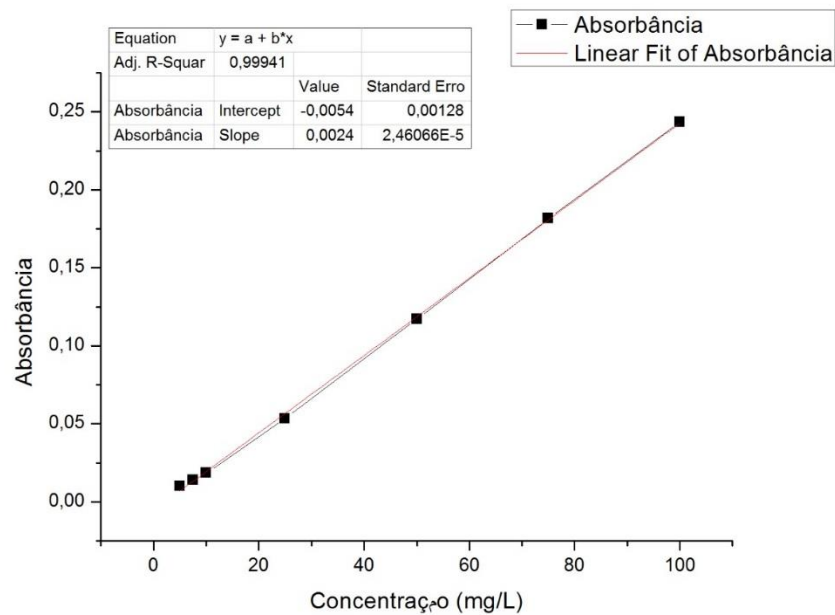


Figura 18. Curva de calibração do Preto Reativo 5 linearizada

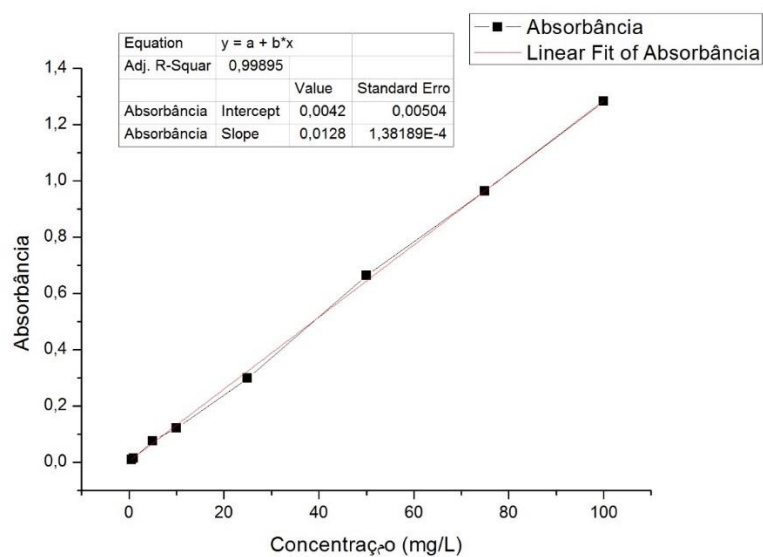


Figura 19. Curva de calibração do Amarelo Reativo HE4R linearizada.

Nos testes de avaliação da influência de metabólitos presentes no extrato enzimático extraído dos FPB utilizou-se a desnaturação enzimática por aquecimento para reduzir a atividade enzimática a zero. A avaliação foi realizada em triplicata com duas concentrações de corante e de enzima, utilizando-se a degradação estática a  $(40 \pm 2)$  °C. Não foram obtidos valores significativos de degradação num período de 24 horas de incubação das amostras, sugerindo, portanto, a ausência de qualquer metabólito produzido pelos microrganismos que seja capaz de degradar as amostras de corante avaliadas. Este teste faz-se necessário para que se possa afirmar que quaisquer valores de degradação obtidos estão ligados à ação das enzimas, neste caso mais especificamente à Lacase.

Em estudo feito por Carneiro, et al, (Carneiro, et al., 2011) determinou-se que a temperatura ideal de atuação da enzima Lacase é de 50°C. Por motivos de inviabilidade técnica não foi possível realizar os testes de degradação utilizando-se a temperatura ótima de atuação da enzima. A temperatura adotada para os testes foi de  $(40 \pm 2)$  °C devido ao uso em conjunto de estufa com temperatura previamente programada.

A avaliação da degradação foi iniciada com uma atividade de lacase de 30 U/L de enzima e os valores foram aumentados até o valor máximo de 300 U/L. As figuras 20 e 21 apresentam os gráficos referentes à eficiência de descoloração dos corantes amarelo e preto, respectivamente, em função da atividade de enzima e concentração de corante presente em meio de tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5, mantidos em incubação a  $(40 \pm 2)$  °C pelo período de 24 horas.

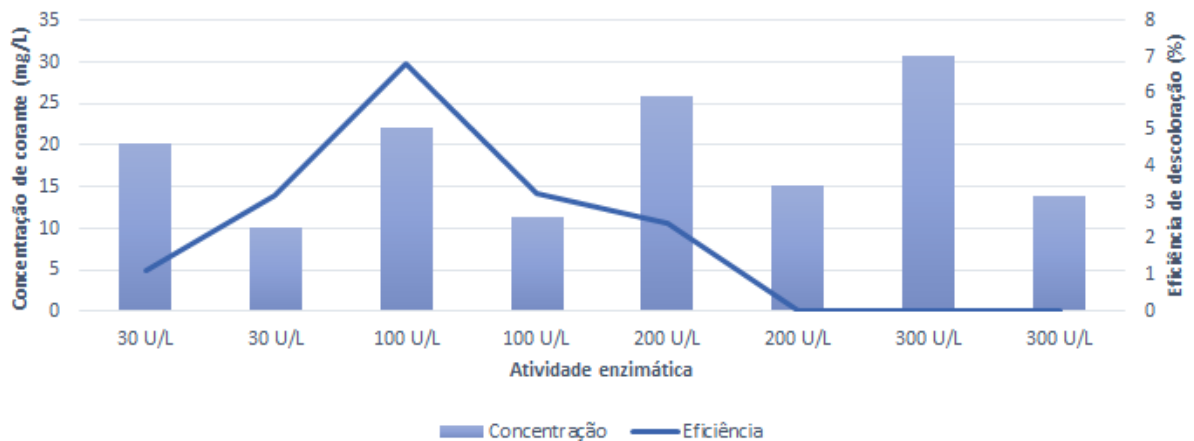


Figura 20. Eficiência de remoção do Amarelo Reativo HE4R em tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5 em função da concentração de corante e atividade enzimática, estático a  $(40 \pm 2)$  °C

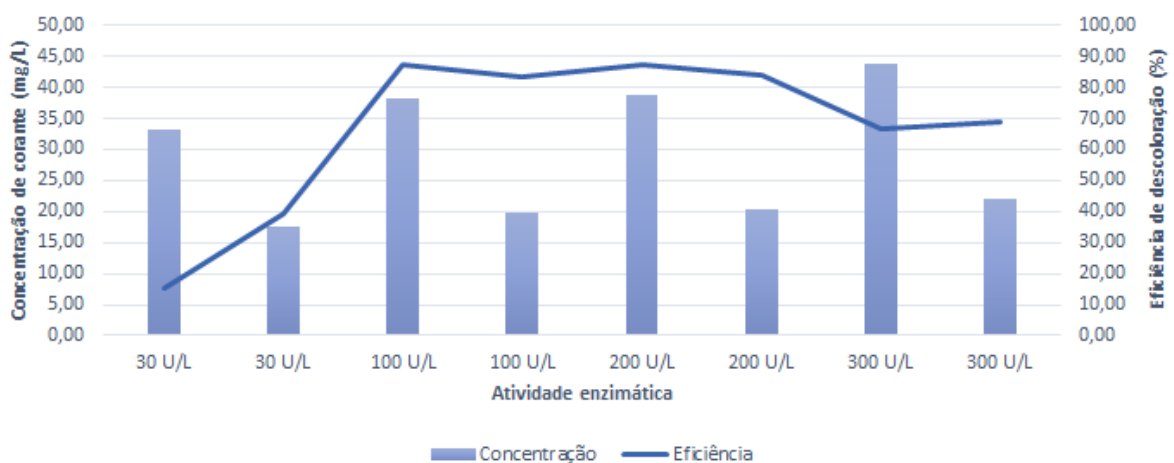


Figura 21. Eficiência de remoção do Preto Reativo 5 em tampão de acetato de sódio 50mM pH 5 em função da concentração do corante e atividade enzimática, estático a  $(40 \pm 2)$  °C

A eficiência na descoloração do corante amarelo foi baixa, cerca de 7% na melhor condição obtida utilizando-se como meio reacional o tampão de acetato de sódio. Já para o corante preto foi obtida uma taxa de descoloração próxima de 90% em várias condições de concentração e atividade enzimática. Essa discrepância na eficiência de degradação dos corantes pode ser explicada pela diferença de complexidade das duas moléculas. Outra possível razão para a baixa degradabilidade do corante amarelo pode estar relacionada à efeitos estéricos, no qual ligantes volumosos podem causar impedimento físico ao ataque da enzima, porém não há como precisar esta teoria devido à indisponibilidade da estrutura molecular do corante.

As figuras 22 e 23 apresentam fotos dos tubos de ensaio de controle e da amostra para os corantes Amarelo e Preto, respectivamente, após o período de degradação em estufa para as duas concentrações avaliadas em 200 U/L de enzima.

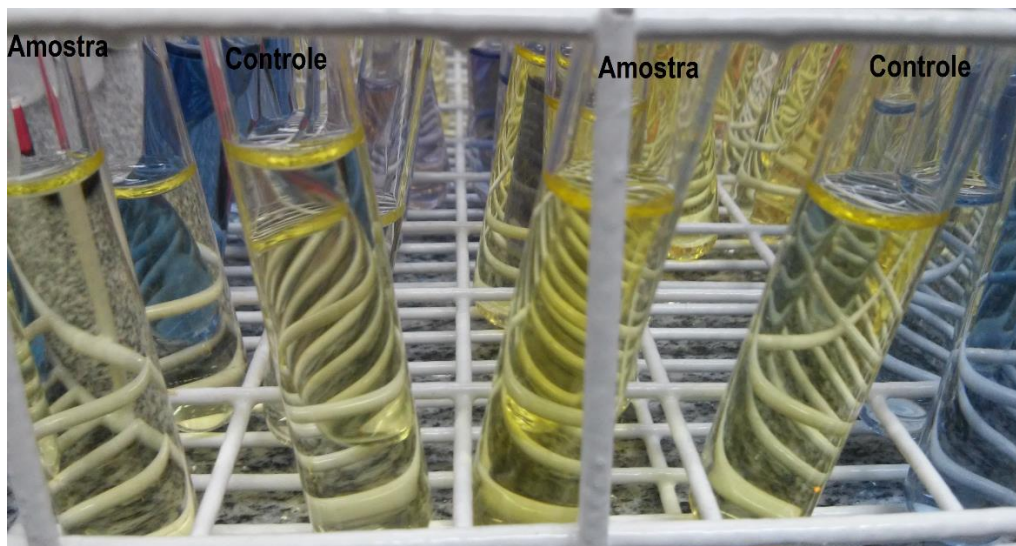


Figura 22. Tubos de controle e amostras com atividade enzimática de 200U/L do corante Amarelo Reativo HE4R em tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5 após 24 horas em estufa a  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$

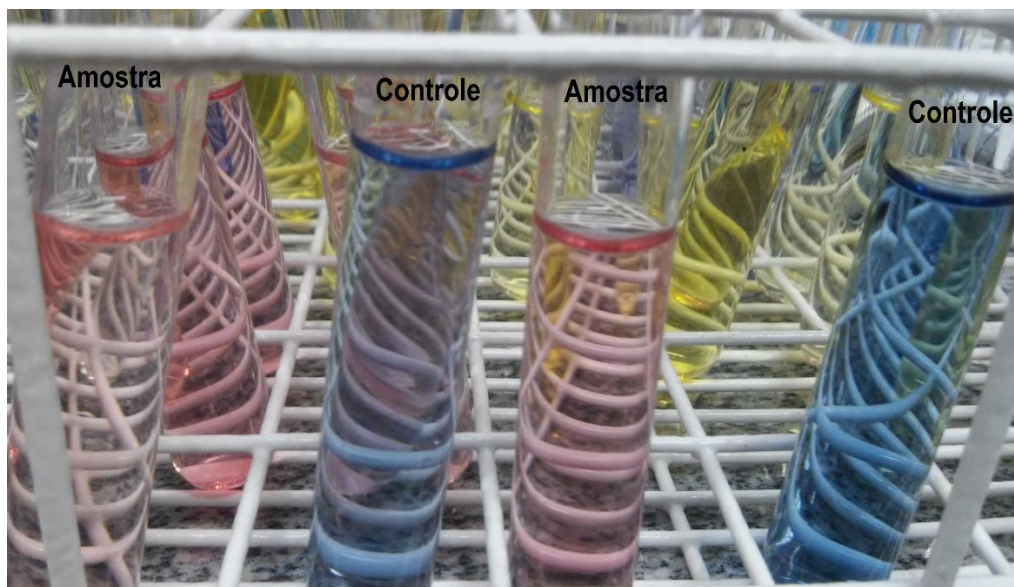


Figura 23. Tubos de controle e amostras com atividade enzimática de 200U/L do corante Preto Reativo 5 em tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5 após 24 horas em estufa a  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$

Na figura 23 pode-se verificar visualmente que houve resultados positivos na degradação do corante preto, o que não ocorre na figura 22 que apresenta a degradação do corante amarelo nas condições mencionadas.

Outra condição de biodegradação avaliada foi a utilização de meio aquoso para a degradação do corante, esta condição teve como objetivo averiguar a necessidade de tamponar o meio para a atuação da enzima. As figuras 24 e 25 apresentam a eficiência de descoloração das diferentes atividades enzimáticas em degradar os corantes amarelo e preto, respectivamente, em diferentes concentrações de corante em meio aquoso, mantido em condições estáticas a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas.

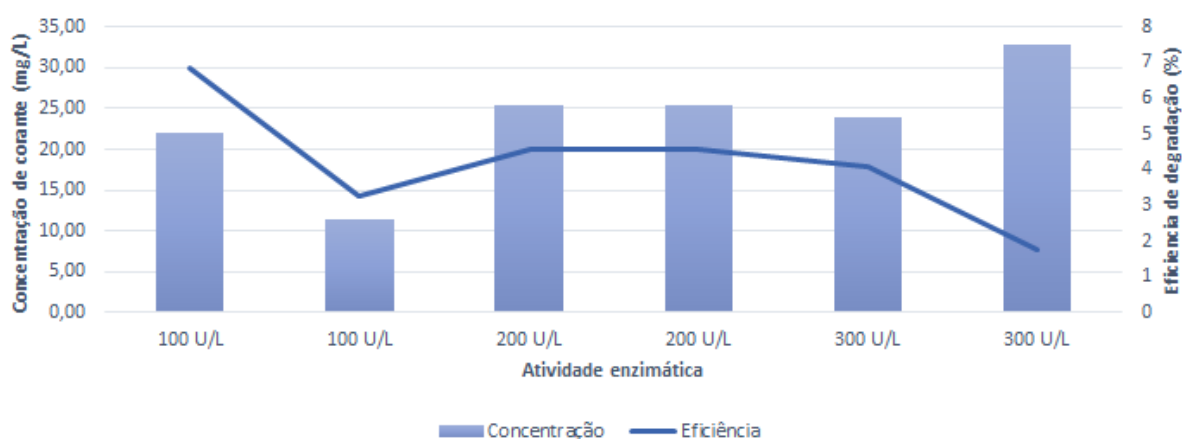


Figura 24. Eficiência de remoção do Amarelo reativo HE4R em solução aquosa em função da concentração do corante e atividade enzimática, estático a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$

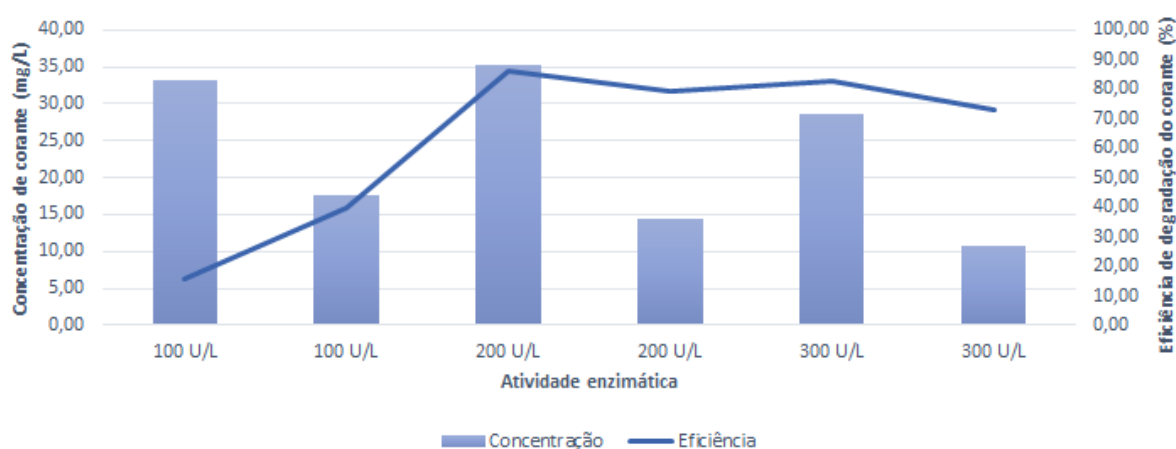


Figura 25. Eficiência de remoção do Preto reativo 5 em solução aquosa em função da concentração do corante e atividade enzimática, estático a  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$



Assim como para o meio reacional de tampão de acetato, a degradação do corante amarelo em meio aquoso obteve uma degradação máxima de aproximadamente 7% na melhor condição obtida. Em ambas as condições avaliadas este máximo foi obtido para a atividade de 100 U/L de enzima para a concentração de 20 mg/L de corante. Para o corante preto reativo a eficiência máxima de degradação obtida foi próxima dos 90% nas duas condições avaliadas para a atividade enzimática de 200 U/L em ambas as concentrações analisadas. Verificou-se também que para o tampão de acetato de sódio na condição de 100 U/L foram obtidos valores de degradação próximos ao máximo, enquanto que para a solução aquosa de corante na mesma atividade enzimática esta eficiência sofreu uma queda superior a 50%.

Avaliando-se as condições estudadas pode-se perceber a alta eficácia do extrato enzimático bruto rico em lacase na degradação do corante têxtil Preto reativo 5, tanto em tampão de acetato de sódio 50mM e pH 5 quanto em água deionizada. A melhor atividade enzimática analisada foi a de 200 U/L para as duas condições de meio utilizadas, sendo elas de 86,0% para a água deionizada e 87,38% para o tampão de acetato de sódio.

#### 6.4. Efeito dos mediadores químicos

Segundo Morozova, et al, (Morozova, et al., 2007) compostos que podem ser utilizados como mediadores químicos pela Lacase são moléculas que servem como substrato para a enzima e geram intermediários com alto potencial redox. Esses intermediários gerados oxidam outros compostos em determinadas condições, auxiliando a ação da enzima. Existe uma vasta gama de compostos que podem ser utilizados como mediadores químicos por serem potencialmente oxidáveis pela lacase.

As condições utilizadas para verificar a influência do mediador na degradabilidade do corante foram as mesmas utilizadas nas análises sem a presença do mediador. Estas condições foram escolhidas para que se possa fazer um paralelo entre as duas condições, identificando a influência da presença do mediador no meio



reacional, seja essa positiva ou negativa. As figuras 26 e 27 apresentam os gráficos de eficiência de remoção dos corantes amarelo e preto, respectivamente, em função da atividade enzimática e concentração de corante presentes em solução contendo tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5, em meio estático a  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$  por um período de incubação de 24 horas.

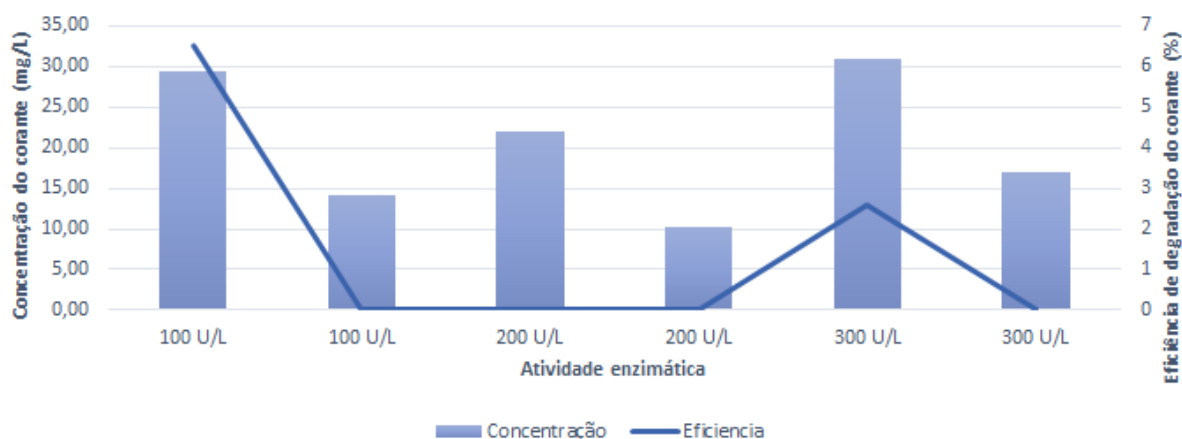


Figura 26. Eficiência de remoção do corante amarelo reativo HE4R em tampão de acetato de sódio 50mM e pH 5 e presença de mediador, estático a  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$  em função da concentração de corante e atividade enzimática utilizada

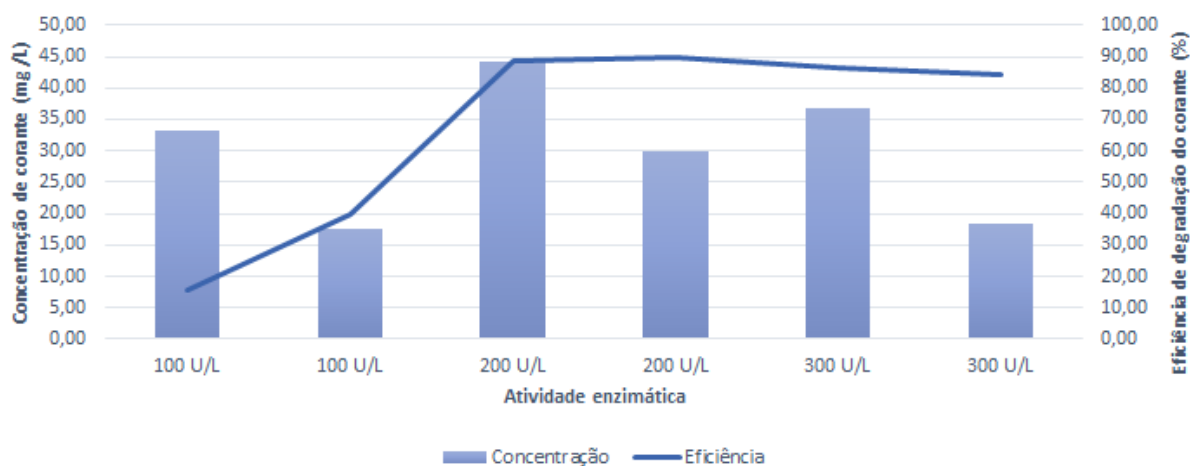


Figura 27. Eficiência de remoção do corante Preto Reativo 5 em tampão de acetato de sódio e mediador, estático a  $40^\circ\text{C}$  em função da concentração de corante e atividade enzimática utilizada

Ao se efetuar uma comparação entre os resultados de degradação obtidos em tampão de acetato de sódio com e sem a presença do mediador verifica-se que para

o corante amarelo a presença do mediador inibiu a atuação da enzima na degradação do corante, reduzindo os valores de degradação. Foram obtidos apenas valores de degradação para as atividades de 100 U/L e 300 U/L de enzima, sendo ambas na concentração de corante mais elevada. Como a degradabilidade média obtida em 300 U/L de enzima foi relativamente baixa cerca de 2,5% o que em termos da concentração de corante equivale a aproximadamente 0,75 mg/L, um valor baixo e que pode ser desconsiderado. A atividade enzimática de 100 U/L foi o único parâmetro em que foi obtido um valor válido de degradação para o corante amarelo, sendo próximo aos valores máximos obtidos para as condições avaliadas sem a presença do mediador, sendo assim pode-se afirmar que não foram obtidos valores significativos de degradação para o corante Amarelo reativo HE4R.

Para o corante preto reativo esta mesma comparação entre os resultados indicam que o mediador escolhido não teve nenhum tipo de influência na degradação do corante. Assim como nos testes realizados em tampão de acetato de sódio e sem mediador químico o valor máximo de degradação obtido ficou próximo dos 90% e nas condições de 200 e 300 U/L de enzima em ambas as concentrações de corante, assim como verificado no gráfico da figura 33. Isto pode ter ocorrido por o ácido 4-hidróxibenzóico não servir de substrato para a ação da enzima ou que o intermediário gerado pelo ataque da enzima não possui alto potencial redox. No caso do corante amarelo este intermediário pode ter atuado na maior estabilização da molécula, impedindo a ação degradante da lacase.

A eficiência de degradação do meio aquoso contendo mediador químico é apresentado nas figuras 28 e 29, para os corantes amarelo e preto reativo, respectivamente, nas condições de análise de  $(40 \pm 2)$  °C e estático, para 24 horas de incubação.

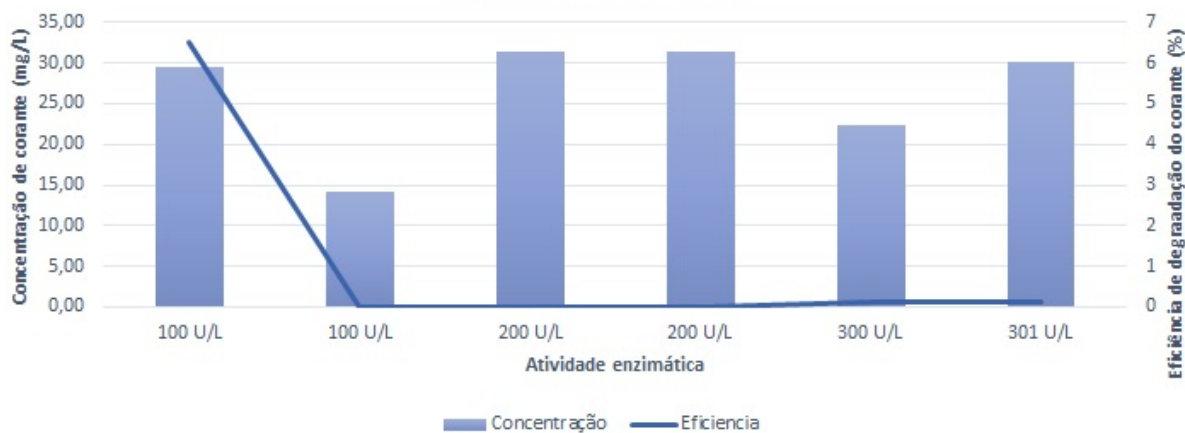


Figura 28. Eficiência de remoção corante do Amarelo Reativo HE4R em solução aquosa e presença de mediador em função da concentração de corante e atividade enzimática, em regime estático a  $(40 \pm 2)$  °C em 24 horas

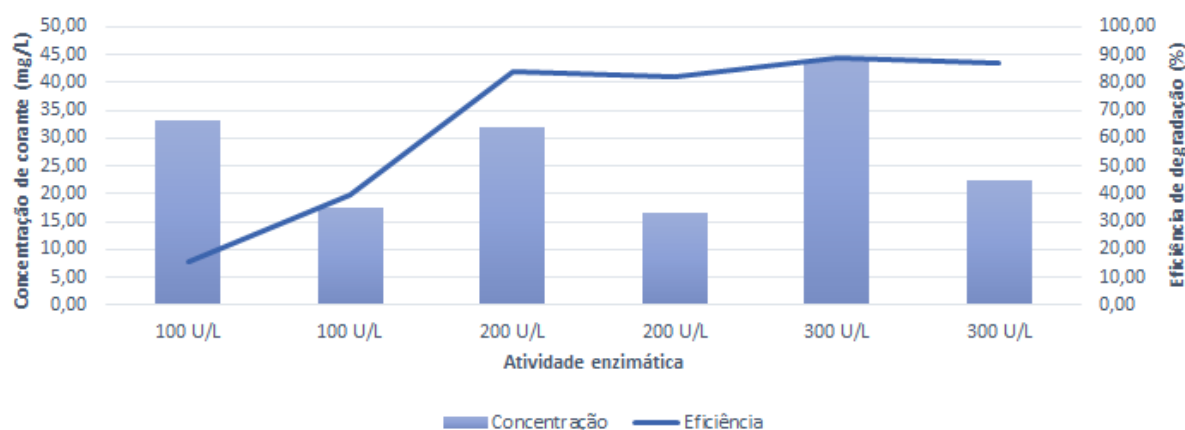


Figura 29. Eficiência de remoção corante do Preto Reativo 5 em solução aquosa e presença de mediador em função da concentração de corante e atividade enzimática, em regime estático a  $(40 \pm 2)$  °C em 24 horas

Avaliando os pares de gráficos das figuras 26 e 28 e 27 e 29 pode-se observar que a conformação deles se manteve praticamente a mesma, indicando que não houve variação no padrão de degradação do corante pela enzima em nenhum dos dois corantes testados. Sendo assim, a presença do mediador não teve contribuição na degradação do corante. A partir dessas 4 análises realizadas na presença do ácido 4-hidroxibenzóico pode-se concluir que esta molécula não atua como um bom mediador químico para a enzima lacase.

## 6.5. Avaliação da degradação e atividade enzimática em função do tempo

As condições escolhidas para o teste foi utilizando-se o corante Preto Reativo 5 em tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5, em estufa a  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , em regime estático e 200 U/L de atividade de lacase no extrato enzimático bruto. Nestas condições obteve uma eficiência de remoção de cor de 87,38% nos experimentos anteriormente apresentados. Foram preparados 14 tubos de ensaio em duplicata para cada ponto analisado, sendo retirados da estufa e colocados no congelador a  $4 ^\circ\text{C}$  para reduzir a atividade da enzima e interromper o processo de degradação. A figura 30 apresenta o processo de degradação do corante e redução da coloração da solução em função do tempo de retirada das amostras.

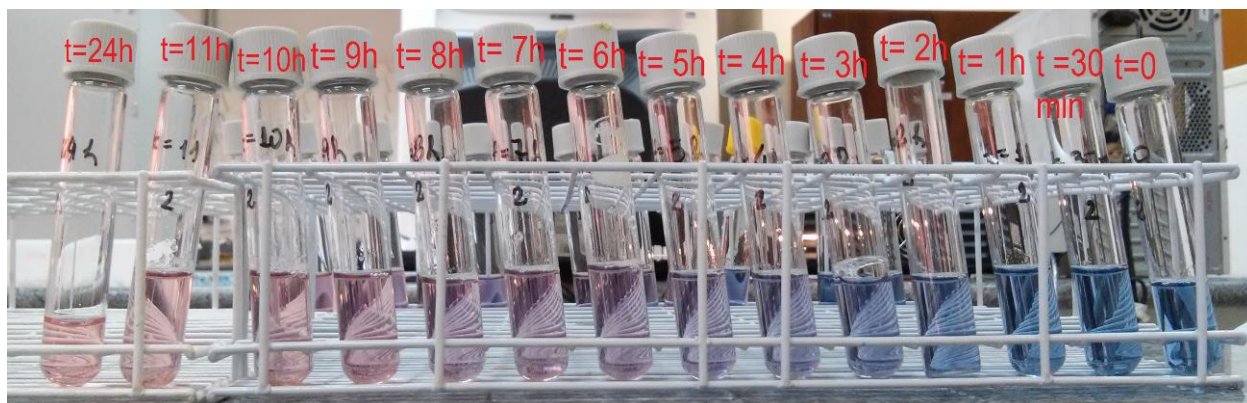


Figura 30. Amostras de corante retiradas em diferentes tempos para interrupção da degradação enzimática

Realizando-se a análise espectrofotométrica das amostras foi obtida uma curva de degradação do corante em função do tempo de retirada da amostra. A figura 31 apresenta o gráfico dos dados obtidos nesta análise.

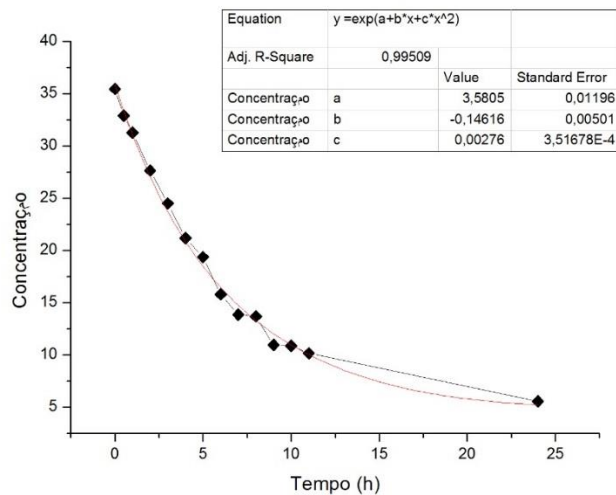


Figura 31. Decaimento da concentração das amostras em função do tempo de retirada das amostras com ajuste exponencial de 3 parâmetros

A partir da curva apresentada pode-se ver uma redução da concentração de corante na amostra de 35mg/L para 5,58 mg/L no período de 24 horas, o que equivale a uma eficiência de cerca de 85% na redução da coloração da amostra.

O ajuste exponencial utilizando-se 3 parâmetros como mostrado na figura 30 foi o que melhor descreveu o decaimento da concentração de corante em função do tempo, representado pela linha vermelha no gráfico acima. O gráfico de dispersão dos resíduos é apresentado na figura 32. A partir da análise da dispersão dos resíduos do modelo de ajuste utilizado pode-se verificar se há ausência de variáveis não consideradas, erros na constância da variância, ajuste de função incorreto e a não aleatoriedade dos erros na análise. Sendo assim faz-se necessário um gráfico de resíduos com boa dispersão e homogeneidade, ter valores próximos a zero e não ter um padrão de erro aparente.

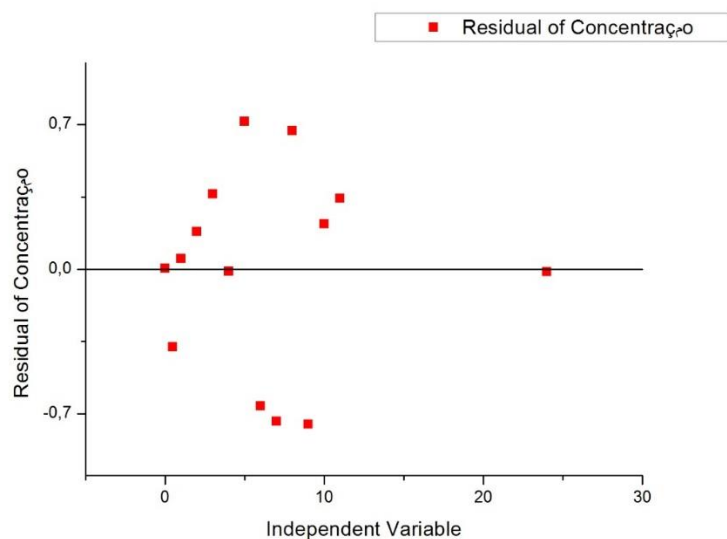


Figura 32. Gráfico dos resíduos da concentração pela variável independente

Como esperado de um bom modelo de ajuste de equação, os pontos residuais têm distribuição homogênea e pouca variação de concentração, além de não apresentarem nenhum padrão de dispersão aparente. A partir disso pode-se afirmar que a degradação do corante sofre um decaimento exponencial com dependência de 3 parâmetros. Este decaimento ocorre com tendência a estabilização em valores próximos aos 87% de remoção de cor. Esta relação de degradação em função do tempo é de alto interesse comercial pois pode-se determinar o tempo de reação da enzima com o corante para obter-se um determinado valor de concentração no efluente a ser tratado.

Também foi analisado o comportamento da enzima Lacase em função do tempo nas mesmas amostras, o gráfico da atividade enzimática pelo tempo é apresentado na figura 33.

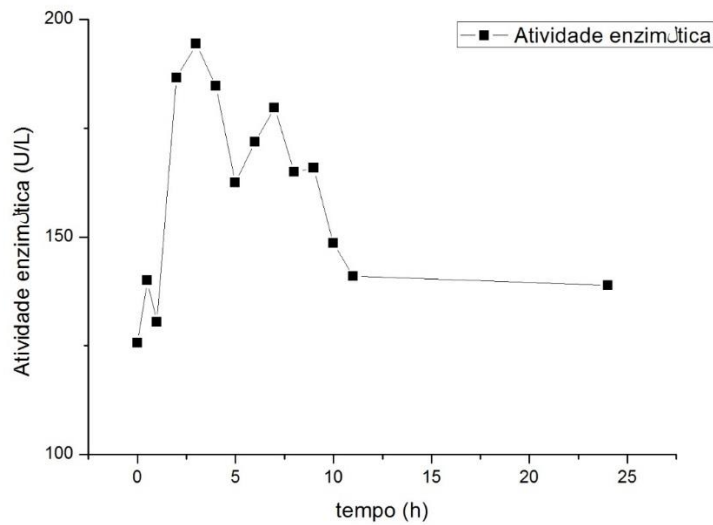


Figura 33. Atividade da enzima lacase na amostra em função do tempo de análise para a adição de 200 U/L de enzima

Apesar da adição de extrato enzimático bruto em todas as amostras ter sido a mesma, 200 U/L de enzima, a atividade obtida na análise do ponto  $t=0$  apresentou o menor valor de atividade, 125,65 U/L, sendo o maior valor foi obtido apenas em 3 horas de incubação, com uma atividade de 194,36 U/L. A atividade da lacase não apresentou um comportamento linear nas amostras, porém a atividade estabilizou em 140 U/L aproximadamente ao final do período de análise. No levantamento bibliográfico realizado, não foram encontrados estudos acerca do comportamento da atividade da lacase extraída quando em solução, atuando na degradação de corantes.

## 7. CONCLUSÕES

A otimização da produção de enzimas lignino modificadoras mostrou-se mais eficiente em meio de cultivo líquido, estático a 28°C contendo resíduos lignino celulósicos em baixas quantidades de massa, de 0,5 a 1,0g, para todos os microrganismos analisados. As condições que apresentaram as mais altas taxas de produção de lacase estiveram centradas no co-cultivo do *Trametes sp.* e *Pycnoporus sp.* e no cultivo isolado do *Pycnoporus sp.*, que indicam que houve maior preferência desse espécime ao resíduo utilizado, porém mais estudos são necessários para resultados mais preciso devido à dificuldade de reprodução do *Pycnoporus sp.*

A utilização de resíduos ligninocelulósicos juntamente com o meio de cultivo PDA teve grande influência no crescimento dos microrganismos estudados, sendo importante para um bom crescimento fungico e redução de custos de meio de cultivo.

A degradação do corante amarelo reativo HE4R não mostrou resultados positivos para a degradação, sendo o valor máximo obtido de aproximadamente 7% de descoloração, que indicam que a enzima não foi capaz de degradar a molécula. Já o corante Preto reativo 5 apresentou altas taxas de degradação, próximas a 90%, para atividades enzimáticas de 200 U/L de enzima nos dois meios avaliados, água deionizada e tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5. A utilização do mediador químico ácido 4-hidróxibenzóico não afetou significativamente a degradação de nenhum dos corantes avaliados nas condições testadas.

A cinética de degradação do corante preto reativo apresentou um decaimento exponencial na taxa de descoloração que variou de 35 mg/L de corante para 5,58 mg/L. A atividade de lacase não apresentou linearidade com o período de incubação, sendo que a atividade obtida no tempo 0 foi a menor e a atividade máxima foi obtida no tempo igual a 3 horas até estabilizar no período de 10 a 24 horas.



## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar análises de toxicidade dos corantes utilizados antes e após o tratamento enzimático para averiguar se há redução na toxicidade do composto tratado. Podem ser feitos também testes utilizando enzimas imobilizadas para o tratamento dos corantes, montando-se um reator que permita a reutilização das enzimas em mais de um teste.

Analisar a viabilidade de utilização dos extratos enzimáticos brutos em um efluente têxtil real, caracterizando-o antes e depois da aplicação do tratamento, obtendo-se assim um comparativo do tratamento do corante e do efluente. Analisar que parâmetros físico-químicos do efluente real precisam ser corrigidos para otimizar o funcionamento da enzima na degradação do corante.

Realizar estudos mais aprofundados acerca da composição química dos extratos enzimáticos obtidos e das enzimas presentes nele, assim como realizar uma caracterização dos compostos ligninocelulósicos utilizados para induzir a produção de lacase pelos fungos.

## REFERENCIAS

- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M. & Legge, R. L., 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Springer Science*, Volume 19, pp. 771 -783.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. & Merchant, R., 1999. Microbial decolorization of textile dyes present in textile industries effluent..
- Bastian, E. Y. O., Rocco, J. L. S., Martin, E. S. & Colaboradores, 2009. *Guia Técnico Ambiental da Indústria Textil*. São Paulo: CETESB.
- Boopathy, R., 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Tecnologia em biorecursos*, Volume 74, pp. 63-67.
- Carlile, M. J. & Watkinson, S., 1996. *The Fungi*. 3ª ed. Londres: Imprensa acadêmica.
- Carneiro, J. L. G., Neto, A. G., Vasconcellos-Neto, J. R. T. d. & MitoshiKamida, H., 2011. *OTIMIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO FomitellaSupina*, Bahia: s.n.
- Castellani, A., 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Jornal Americano de Medicina Tropical e Higiene*.
- Cerqueira, A. A., 2006. *Aplicação da técnica de eletrofloculação no tratamento de efluentes têxteis*, s.l.: s.n.
- CETESB e SindiTêxtil, 2009. *Guia técnico ambiental da indústria têxtil*, São Paulo: s.n.
- Chequer, F. M. D. et al., 2013. Dyeing Process and Environmental Impact. Em: *Textile Dyes*. s.l.:s.n.
- Chi, Y., Hatakka, A. & Majjala, P., 2007. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 59, p. 32–39.
- Cisneros R. L., E. A. G. & I., L. M., 2002. Photodegradation of an azo dye of the textile industry. *Chemosphere*, Volume 48, pp. 393-399.
- Domingues, R. C., 2009. *Biodegradação de corantes reativos: Composição do meio de cultura e produção de atividade descolorante*. Curitiba: s.n.
- Durán, N. & Esposito, E., 2000. Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase: like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Aplicações de catalise em biotecnologia e meio ambiente*, pp. 1-117.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. & Penninckx, M., 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Volume 35, pp. 1531-1538.
- Filho, J. M. M. A., 2008. *Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar*. s.l.:s.n.
- Fleck, L., 2011. *Aplicação do controle estatístico de processos ao tratamento de um efluente têxtil por eletrofloculação*, Medianeira: s.n.

- Ganodermaieri, G., Cennamo, G. & Sannia, G., 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Tecnologia em enzimas e microbiologia*, pp. 17-24.
- Gaylarde, C. C., Bellinasso, M. L. & Manfio, G. P., 2005. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da bioremediação de xenobióticos. *iotecnologia, ciência e desenvolvimento*, Volume 34, pp. 36-43.
- Guarattini, I. C. C. & Zanoni, M. V., 2000. Corantes Têxteis. *Química Nova*, Volume 23, pp. 71-78.
- Hatakka, A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. Volume 13, pp. 125-135.
- Hou, H. et al., 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Processos de Bioquímica*, Volume 39, pp. 1415-1419.
- Jin, X. C., Liu, C. G., Xu, Z. H. & Wu, W. Y., 2007. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6 .. Volume 74, pp. 239 - 243.
- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N. & Elisashvili, V., 2006. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 22, pp. 391-397.
- Khelifi, E. et al., 2008. Effect of nitrogen and carbon sources on indigo and congo red decolorization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. pp. 1056-1062.
- Kirk, T., Tien, M. & Faison, B. D., 1984. Biochemistry Of The Oxidation Of Lignin By Phangerochate *Chrysosporium*. *Biotechnology Advances*, Volume 2, pp. 183-199.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D. & Dehwa, T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management. *Jornal internacional de ciência do ambiente*, pp. 1079-1093.
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Moraes, S. G. d. & Dur, N., 2001. Novas tendências no tratamento de efluêntes têxteis. *Química Nova*, pp. 78 - 82.
- Leonowicz, A. et al., 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi.
- Melo, I. S. & Azevedo, J. L., 2008. *Microbiologia ambiental*. Volume 2, pp. 304-319.
- Morozova, O. V. et al., 2007. "Blue" Lacases. *Biokhimiya*, Volume 72, pp. 1396-1412.
- Niebisch, C. H., 2009. *Biodegradação do corante têxtil remazol azul por Lentinus crinitus, Lepista sordida E HydnoPolyporus fimbriatus*. s.l., s.n.
- Peixoto, F., G., M. & Rodrigues, K., 2013. Corantes Têxteis: Uma Revisão. *HOLOS*, Volume 5, pp. 98-106..
- Pointing, S. B., 2000. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Tecnologia Aplicada*, pp. 63-67.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. & Nigam, P., 2001. *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*, s.l.: Elsevier.
- Rodrigues, E., Lírio, V. S. & Lacaz, C. d. S., 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, pp. 159-165.

Salvi, M. B., 2011. *Fungos basidiomicetos em bioremediação*. São Paulo: Instituto de botânica de São Paulo.

Silvera, S. S. B. & Santanna, F. S. P., 1990. Poluição Hídrica. Em: *Meio Ambiente: aspectos técnicos e econômicos*. s.l.:s.n.

Souza, C. R. L. d., 2006. *DEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS E REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS POR PROCESSOS AVANÇADOS ENVOLVENDO FERRO METÁLICO*. Curitiba: s.n.

Wariishi, H., Valli, K. & Gold, M., 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem*, Volume 267, p. 23688–23695.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos, S. N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Elsevier*, pp. 161 - 187.

Zollinger, H., 1987. Syntheses, properties and applications of organic dyes pigment. *Color chemistry*, pp. 83 - 148.