



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Degradação de corantes sintéticos utilizando o *Ceriporiopsis subvermispora*

Simone Cristina do Carmo

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Dezembro/2016

Degradação de corantes sintéticos utilizando o *Ceriporiopsis subvermispora*

Simone Cristina do Carmo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco
Dezembro/2016

RESUMO

O tratamento de efluentes industriais é ainda um grande desafio, principalmente pelas características variadas dos efluentes. Os corantes sintéticos são uma das grandes preocupações, pois eles são difíceis de serem degradados e removidos do meio ambiente. Atualmente, vários métodos de tratamento alternativo têm sido estudados e testados para a remoção de cor, dentre eles a degradação microbiológica ou enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de degradação de corantes sintéticos pelo fungo da podridão branca *Ceriporiopsis subvermispota*. A metodologia consistiu em produzir enzimas ligninolíticas através da fermentação em cultivo submerso e utilizar o extrato enzimático na degradação de corantes, bem como cultivar o fungo em meio sólido (ágar + corante), em duas concentrações, e analisar a degradação. O fungo *C. subvermispota* foi capaz de produzir a lacase com atividade enzimática de $46,86 \pm 0,7 \text{ UI.L}^{-1}$. Utilizando o extrato enzimático, somente os corantes pardo de bismarck Y e preto de eriocromo T apresentaram degradação de 51,9% e 67,0%, respectivamente. Três dos cinco corantes estudados foram degradados utilizando o estudo de degradação em ágar. O chromotrope 2R foi o corante que obteve a maior degradação de 67,6% e 80,6%, para as concentrações 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} , respectivamente. Os resultados obtidos comprovam a capacidade do fungo *C. subvermispota* e suas enzimas ligninolíticas (MnP e lacase) em degradar corantes com diferentes estruturas químicas, confirmando o potencial desse fungo.

Palavras-chave: *Ceriporiopsis subvermispota*. Degradação. Enzimas ligninolíticas. Corantes sintéticos. Lacase.

ABSTRACT

The industrial wastewater treatment is still a great challenge, especially due to the different effluents characteristics. Synthetic dyes are one of the major concerns because they are difficult to be degraded and removed from the environment. Currently, several alternative treatment methods have been studied and tested for color removal, including microbiological or enzymatic degradation. The objective of this work was to evaluate the degradation potential of synthetic dyes by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. The methodology consisted of producing ligninolytic enzymes through the fermentation in a submerged culture and using the enzymatic extract in the degradation of dyes, as well as cultivating the fungus in a solid medium (agar + dye), in two concentrations, and analyze the degradation. The fungus *C. subvermispota* was able to produce laccase with enzymatic activity of $46.86 \pm 0.7 \text{ UI.L}^{-1}$. Using the enzymatic extract, only the dye of bismarck brown Y and eriochrome black T presented degradation of 51.9% and 67.0%, respectively. Three of the five dyes studied were degraded using the agar degradation study. The chromotrope 2R was the dye that achieved the highest degradation, 67.6% and 80.6%, for the concentrations 50mg.L^{-1} and 100mg.L^{-1} , respectively. The results demonstrate the capacity of the fungus *C. subvermispota* and its ligninolytic enzymes (MnP and laccase) to degrade dyes with different chemical structures, confirming the potential of this fungus.

Key-words: *Ceriporiopsis subvermispota*. Degradation. Ligninolytic enzymes. Synthetic dyes. Laccase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS	9
3.2 CORANTES	10
3.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS	13
3.3.1 Métodos Físicos, Químicos e Físico-Químicos	14
3.3.2 Métodos Biológicos	16
3.4 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS	17
3.4.1 O fungo <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	18
3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	20
3.5.1 Lignina-Peroxidase (LiP)	21
3.5.2 Manganês-Peroxidase (MnP)	22
3.5.3 Lacase.....	24
3.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS	26
3.6.1 Meio De Cultivo.....	26
3.6.2 Indutor	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO	30
4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	30
4.2.1 Massa Seca	30
4.3 FERMENTAÇÃO <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	31
4.3.1 Meio De Cultivo.....	31
4.3.2 Condições De Cultivo	31

4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	31
4.4.1 Manganês-Peroxidase (MnP)	32
4.4.2 Lacase.....	32
4.4.3 Fenol-Oxidase Total (FOT).....	32
4.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO	32
4.6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO EM ÁGAR	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	34
5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO	37
5.3 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO EM ÁGAR	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental tanto do solo, quanto do ar ou da água é um dos maiores problemas enfrentados pela ciência, uma vez que a minimização ou até mesmo a erradicação da mesma requer um alto padrão de eficiência nos procedimentos realizados (OLIVEIRA, 2003).

Para tanto, a legislação ambiental tem sido cada vez mais rígida de modo a não permitir a prática de ações prejudiciais ao meio ambiente. Por isso, os processos industriais que produzem efluentes sólidos, líquidos ou gasosos, em maior ou menor quantidade, devem tratá-los antes de despejá-los na natureza, de tal forma que estes atendam aos padrões estabelecidos pela legislação (OLIVEIRA, 2003).

Dentre os poluentes encontrados em um efluente industrial, os corantes sintéticos são uma das grandes preocupações no que se refere à indústria e meio ambiente. Apesar de serem de extrema importância, principalmente na indústria têxtil, eles são difíceis de serem degradados e removidos do meio ambiente. Afinal, possuem estruturas fenólicas ou aromáticas recalcitrantes, permanecendo assim por muito tempo no ambiente (PINKOSKI, 1997; OLIVEIRA, 2003).

Existem atualmente, diversos estudos sobre os variados tipos de tratamento e remoção desses compostos de difícil degradação, desde tratamentos físicos e químicos, a tratamentos biológicos. Dentre estes, pode-se citar o tratamento biológico com a utilização de microrganismos produtores de enzimas oxidativas (TROMBINI; OBARA-DOI, 2012).

A degradação de corantes por determinados fungos é efetiva e bastante estudada, como a degradação e a mineralização de corantes por certos grupos de fungos causadores da podridão branca da madeira, capazes de degradar diversos tipos de poluentes (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

As enzimas fenol-oxidases, dentre elas a lacase, produzidas por esse tipo de fungo tem a capacidade de agir como catalisadores na transformação de resíduos aromáticos e fenólicos, auxiliando na degradação dos corantes sintéticos (PINKOSKI, 1997).

Com base no exposto conclui-se que é de suma importância o tratamento dos efluentes industriais, a fim de minimizar a poluição e possíveis efeitos prejudiciais ao meio ambiente. Sendo a utilização de enzimas produzidas por microrganismos uma alternativa como tratamento biológico para a degradação de compostos poluentes, como os corantes sintéticos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de degradação de corantes sintéticos pelo fungo da podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a produção das enzimas ligninolíticas manganês-peroxidase (MnP), lacase e fenol-oxidase total (FOT) pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*;
- Avaliar a ação do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora* sobre os corantes sintéticos alaranjado de metila, azul de metileno, chromotrope 2R, cristal violeta, índigo carmim, pardo de bismarck Y, preto de eriocromo T, safranina T e vermelho de fenol;
- Analisar a eficiência do fungo *Ceriporiopsis subvermispora* na degradação, em meio sólido, dos corantes sintéticos alaranjado de metila, azul de metileno, chromotrope 2R, índigo carmim e vermelho de fenol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS

A relação entre processos industriais e meio ambiente é tema de muita discussão na atualidade. Sendo a contaminação das águas um dos assuntos de maior interesse, tornando-se um grande desafio econômico, social e ambiental (QUADROS, 2005; OTTONI, 2012).

A qualidade da água é aspecto indispensável quando se trata dos seus principais usos, em especial, para fins como o abastecimento humano. Este uso tem sofrido restrições significativas em função de prejuízos nos corpos d'água, provenientes das ações naturais e antrópicas as quais alteram os aspectos de qualidade e quantidade de água disponível (SOUZA et al., 2014).

Em termos dos padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos destaca-se a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011, que aborda a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A Resolução CONAMA nº 430/2011 vigente, complementa e altera a Resolução nº 357/2005 quanto às condições e padrões de lançamento de efluentes em geral. Ambas as resoluções não estipulam valores máximos para o parâmetro cor, mas afirmam que o lançamento não pode transformar a característica de origem do corpo receptor (COSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, 2011).

Quando não tratadas de forma correta, e lançadas nos corpos d'água, as águas residuais geradas por indústrias de corantes ou que envolvam corantes em seu processo podem diminuir a transparência da água e a penetração de luz solar, mesmo que a cor não seja detectada visualmente. Além disso, tais resíduos são tóxicos para os organismos vivos, podendo causar desequilíbrio no ambiente aquático (SILVA, 2011).

O efluente gerado pela indústria têxtil, por exemplo, possui ampla diversidade de contaminantes, como compostos inorgânicos, polímeros e compostos orgânicos, dentre esses os corantes. Tais corantes, principalmente os azo-derivados, devem ter liberação controlada devido ao seu potencial mutagênico/carcinogênico. Entretanto, a legislação ambiental é omissa quanto à classificação dos corantes como contaminantes ambientais, proibindo apenas a alteração das características de origem da água, dentre elas a cor (QUADROS, 2005; CAMPOS, 2013; ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO – ALESP).

3.2 CORANTES

Corantes são, normalmente, substâncias orgânicas com estrutura aromática ou heterocíclica não saturada. São solúveis em meio básico, neutro ou ácido, e são capazes de transferir sua cor natural para os materiais sobre os quais se fixam. Além disso, os corantes devem ser estáveis à luz, aos processos de lavagem e apresentar fixação uniforme (KAMMRADT, 2004; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Até a metade do século XIX os corantes existentes eram originados de compostos naturais, como vegetais, insetos, moluscos e minerais. Alguns desses corantes naturais ainda continuam sendo utilizados até hoje, como o índigo, a alizarina e a henna (KAMMRADT, 2004; MANCILHA, 2006).

O primeiro corante sintético surgiu na Inglaterra em 1856, descoberto pelo químico Willian Henry Perkin (1838-1929). Tal corante surgiu da oxidação da anilina (C_6H_7N) com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), gerando como produto um precipitado avermelhado denominado Malva (mauveína). Desde então, os corantes naturais tem dado cada vez mais lugar aos corantes sintéticos, devido à facilidade de obtenção. Por isso, atualmente, a maioria dos pigmentos e corantes comerciais encontrados são sintéticos (KAMMRADT, 2004; BARRETO, 2006; MANCILHA, 2006).

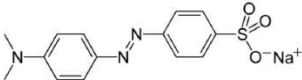
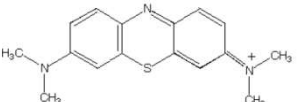
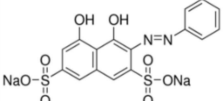
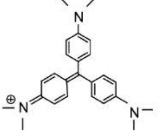
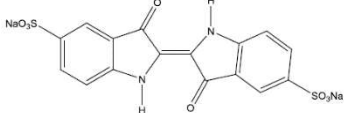
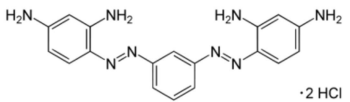
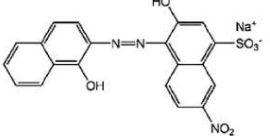
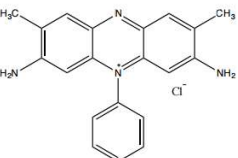
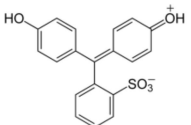
Existem dois tipos de corantes, os quais podem-se diferenciar pela solubilidade, os pigmentos e os corantes solúveis. Os pigmentos são considerados como pequenos corpúsculos de corantes insolúveis que, na presença de substâncias aglutinantes, conseguem tingir superficialmente um material. Esses pigmentos têm como característica a baixa toxicidade, devido a sua biodisponibilidade limitada. Já os corantes solúveis, são capazes de penetrar e reagir com a fibra do material, ocorrendo o tingimento do mesmo. Eles possuem uma alta toxicidade, graças às suas solubilidade e biodisponibilidade elevadas, ou seja, a sua capacidade de ser facilmente absorvido (KAMMRADT, 2004).

Corantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e o método de aplicação. A classificação quanto à estrutura química leva em consideração o grupo cromóforo (grupo funcional), responsável pela cor de cada corante. Os grupos cromóforos mais importantes são: azo, carbonila, ftalocianina, enxofre, etileno, nitro e nitroso. De acordo com a forma de aplicação, os corantes podem ser classificados em: ácidos, de mordente, metalizados, diretos, reativos, de cuba, dispersos ou básicos (ORTIZ-MONSALVE, 2015).

São inúmeros os tipos de corantes existentes. Todos os anos, várias novas substâncias surgem e são descritas na literatura. A classificação é feita pelo Colour Index International

(C.I.), a maior referência global em se tratando de corantes e pigmentos. Na Tabela 1 é possível observar a classificação quanto à estrutura química, a estrutura molecular e o comprimento de onda máximo (nm) dos corantes utilizados neste trabalho (KAMMRADT, 2004; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Tabela 1 – Classificação, estrutura molecular e fórmula molecular dos corantes em estudo, onde C.I. = Colour Index International.

Corantes	Estrutura Molecular	Comprimento de Onda Máximo (nm)	Classificação
Alaranjado de Metila (C.I. 13025)		501 – 504	Azo (mono)
Azul de Metileno (C.I. 52015)		663 – 667	Tiazina
Chromotrope 2R (C.I. 16570)		510 – 530	Azo (mono)
Cristal Violeta (C.I. 42555)		583 – 587	Trifenilmetano
Índigo Carmim (C.I. 73015)		608 – 612	Indigóide
Pardo de Bismarck Y (C.I. 21000)		—	Azo (di)
Preto de Eriocromo T (C.I. 14645)		612 – 616	Azo (mono)
Safranina T (C.I. 50240)		520 – 530	Azina
Vermelho de Fenol		432 – 490	Trifenilmetano

Os azo corantes representam cerca de 60% a 80% dos corantes mais utilizados no mundo atualmente. Eles apresentam um ou mais grupamentos ($-N=N-$) ligados a estruturas aromáticas, sendo divididos em mono, di e triazo. Esse tipo de corante é constituído por dois

compostos reativos, que produzem pigmento insolúvel dentro da fibra, devido sua capacidade de formar ligações covalentes com grupos hidroxilas das fibras celulósicas. Além disso, apresentam boa estabilidade à luz e resistência a alvejantes, em geral. Mas, apesar de ser o maior grupo de corantes orgânicos produzido, esse tipo de corante tem chamado muito a atenção devido à sua potencial formação de aminas, benzinas e outros intermediários cancerígenos (QUADROS, 2005; AGUIAR, 2006; BARRETO, 2006; CHAGAS, 2009).

O alaranjado de metila (C.I. 13025), $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$, é também conhecido como ácido laranja 52. Ele costuma ser usado como indicador de pH, mudando de vermelho para amarelo (ponto de viragem pH 3,1-4,4) a 25°C. Além disso, é utilizado em titulações que envolvem bases fracas. O alaranjado de metila possui diversas aplicações nas indústrias químicas, tecnológicas e biomédicas. Sendo as cores brilhantes específicas do mesmo a característica mais importante, e que faz dele o corante mais utilizado nas indústrias têxtil, fotográfica e de pintura (MANCILHA, 2006; LEAL, 2011).

O azul de metileno (C.I. 52015), $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$, é um corante catiônico pertencente ao grupo tiazina. Ele é muito utilizado nas áreas da biologia, medicina e química, por exemplo, no tingimento de algodão, lã e papel, tinturas para cabelos, entre outros. Ficar exposto a esse corante pode causar danos à saúde, como forte dor de cabeça, diarreia, náuseas, etc (MANCILHA, 2006; OLIVEIRA et al., 2013; ALFREDO et al., 2015).

O chromotrope 2R (C.I. 16570) ou vermelho ácido 29, $C_{16}H_{10}N_2O_8S_2N_2$, é um corante ácido de coloração avermelhada e pertence à classe dos corantes azo. Ele é muito usado em indústrias têxteis, na área farmacêutica e em laboratórios como indicador, e na coloração de plasma em histologia animal (CAMPOS, 2013; SALEM, 2015).

O cristal violeta (C.I. 42555), também chamado de violeta básico 3 ou violeta de metila 10B, $C_{25}H_{30}ClN_3$, é um corante catiônico da classe dos triarilmetanos/trifenilmetanos. Ele possui diversas aplicações, podendo ser utilizado em processos industriais e até na medicina. Pode ser usado como indicador de pH, como componente na coloração de Gram, na coloração de algodão e seda, entre outros. O contato prolongado com o cristal violeta pode ser prejudicial à saúde, causando irritação no trato digestivo, na pele e até mesmo cegueira permanente (TISCA, 2011; BERTOLINI, 2014).

O índigo carmim (C.I.73015), $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$, é um corante ácido pertencente ao grupo dos indigóides, com comportamento de um ácido orgânico fraco. Ele possui transição de coloração para o azul em pH abaixo de 12 e para o amarelo em pH acima de 12. O índigo carmim é altamente tóxico, com capacidade de causar irritações nos olhos e na pele. Além

disso, como a maioria dos corantes, ele pode ser cancerígeno e fatal, atrapalhando o desenvolvimento neural (SAGGIORO et al., 2012; CREMA, 2015).

O pardo de bismarck Y (C.I. 21000), $C_{18}H_{20}N_8Cl_2$, é um corante básico, catiônico, pertencente ao grupo dos azoicos. Ele é solúvel em água e se apresenta na forma de um cloridrato. Costuma ser usado em preparação de soluções para coloração biológica, como corante de cabelo, couro e na indústria têxtil. A quebra da sua estrutura pode liberar diversas aminas aromáticas com poder de toxicidade (MUNEER et al., 2005; SORIANO et al., 2014).

O preto de eriocromo T (C.I. 14645), $C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$, é um corante aniônico do grupo dos azoicos, com comportamento de um ácido fraco. Ele é muito usado como indicador de íons metálicos (Mg, Mn, Zn, Cd, Hg, Pb, Ca) em titulações complexo metálicas, mas também pode ser utilizado como indicador ácido-base, uma vez que seus ácidos e bases conjugados possuem colorações diferentes (ALMEIDA, 2015).

O safranina T (C.I. 50240) ou 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-cloreto de felina, $C_{20}H_{19}N_4Cl$, é um corante catiônico. Ele é muito usado pela indústria têxtil para tingir algodão, lã, seda, couro e papel. Embora não seja considerado perigoso em relação a outros corantes comerciais, o contato prolongado pode provocar irritação nos olhos, no trato respiratório, gerar danos permanentes na córnea e causar danos à pele (TEODORO, 2015).

O vermelho de fenol, também conhecido como fenolsulftaleína, $C_{19}H_{14}O_5S$, é um corante com comportamento de um ácido orgânico fraco e integra a classe dos triarilmetanos/trifenilmetanos. Ele possui transição de coloração do amarelo para o vermelho quando o pH está entre 6,6 e 8,0, e coloração rosa brilhante em pH acima de 8,1. O vermelho de fenol é muito utilizado como indicador de pH, sendo amarelo em pH 7,2 e vermelho em pH 8,8 (MANCILHA, 2006; CREMA, 2015).

Devido suas estruturas químicas diversificadas, os corantes podem reagir com compostos inorgânicos ou formar compostos que são de difícil degradação. A degradação, por fungos de podridão branca, de uma grande variedade de corantes tem sido estudada há algum tempo. Os resultados positivos observados em diferentes estudos fizeram desses basidiomicetos os microrganismos mais reconhecidos para a degradação de corantes sintéticos (AGUIAR, 2006; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

3.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

O tratamento de efluentes industriais é ainda um grande desafio, principalmente pela grande variedade de produtos de diferentes características presentes nesses efluentes. Além

das características do efluente, a escolha do processo adequado vai depender da qualidade do efluente após o tratamento, do custo, da disponibilidade de área e tecnologia (DAMINELLI, 2008; CAMPOS, 2010).

O tratamento convencional de águas residuais de indústrias, em geral, utiliza a combinação de tratamentos primários, secundários e terciários. No tratamento primário há a remoção dos sólidos sedimentáveis e suspensos, por sedimentação e floculação. No tratamento secundário ocorre a degradação da matéria orgânica, normalmente, por métodos biológicos (microrganismos). O tratamento terciário busca eliminar poluentes específicos, tóxicos ou não biodegradáveis, através de filtração por membrana ou adsorção em carvão ativado (KAMMRADT, 2004; NASCIMENTO, 2008).

Os métodos citados anteriormente são eficientes na remoção de matéria orgânica, mas podem não ser eficientes na degradação de alguns compostos recalcitrantes, como surfactantes e corantes. Ambos os processos são similares no que se refere ao destino dos corantes, pois esses compostos são apenas retirados da fase líquida, mas continuam presentes nos lodos gerados, seja no lodo físico-químico ou no lodo biológico, ou ainda, adsorvido no carvão ativado. Esse fato gera outro problema, pois é necessário ter cuidado quanto à disposição ou tratamento posterior desses resíduos (KAMMRADT, 2004; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Atualmente, vários métodos de tratamento alternativo físico, químico e biológico têm sido estudados e testados para a remoção de cor, como adsorção em matrizes orgânicas ou inorgânicas, processos avançados de oxidação, degradação microbiológica ou enzimática, entre outros (NASCIMENTO, 2008; OLIVEIRA, 2010).

3.3.1 Métodos Físicos, Químicos e Físico-Químicos

3.3.1.1 Coagulação e Floculação

A floculação é responsável por agregar pequenas partículas formando partículas maiores para melhorar a remoção por sedimentação gravitacional em decantadores, reduzindo a concentração de corantes e outros compostos orgânicos. Para que isso ocorra, adiciona-se compostos químicos (agentes coagulantes), como sulfato de alumínio, sulfato ferroso, sulfato de cobre, etc., sozinhos ou combinados. A vantagem deste método é o curto tempo de retenção, o que faz da coagulação uma técnica muito utilizada. O alto custo dos compostos químicos, juntamente a problemas com secagem e descarte do lodo formado, e a alta

concentração de cátions residuais, os quais permanecem no sobrenadante, são desvantagens deste método (CHAGAS, 2009; CAMPOS, 2010; OLIVEIRA, 2010).

3.3.1.2 Adsorção

A adsorção é um fenômeno rápido que remove o adsorbato da fase aquosa ou gasosa, e o retém em fase sólida. A remoção de cor resulta de dois mecanismos: adsorção e troca iônica, sendo influenciada por alguns fatores físico-químicos, como a interação entre corante e adsorvente, a área superficial do adsorvente, o tamanho da partícula, a temperatura, o pH e o tempo de contato. Os adsorventes podem ser carvão ativado, sílica gel, resinas de troca iônica, derivados de celulose, entre outros. A adsorção é um processo estável e eficiente, que produz produtos de alta qualidade. Entretanto, o material adsorvente pode ter alto custo e/ou causar reações laterais, é necessário o controle de vários fatores para que o processo ocorra satisfatoriamente e o resíduo pode apresentar problemas de disposição (KAMMRADT, 2004; DAMINELLI, 2008; CAMPOS, 2010).

3.3.1.3 Membranas

O uso de membranas de osmose reversa, microfiltração, nanofiltração ou ultrafiltração, clarifica, concentra e separa o corante do efluente. O tipo de membrana a ser utilizada, com a porosidade adequada, é escolhido de acordo com a temperatura e as características do efluente. As vantagens deste método é a resistência à temperatura, condições químicas e biológicas adversas. O fato de o resíduo concentrado poder apresentar problemas de disposição, atrelado ao alto investimento inicial, a possibilidade de obstrução dos poros e a necessidade de repor a membrana, são as desvantagens deste método (KAMMRADT, 2004; OLIVEIRA, 2010).

3.3.1.4 Processos oxidativos avançados (POA's)

Os processos oxidativos caracterizam-se pela utilização da oxidação química para remover substâncias do efluente, produzindo radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) reativos ($E^\circ = 2,8$). Isso ocorre através do uso de agentes oxidantes como o ozônio (O_3), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), etc., sozinhos ou combinados com ultravioleta (UV), que interagem com os

compostos e mudam a estrutura dos mesmos. A oxidação química remove o corante do efluente pela quebra dos anéis aromáticos das moléculas de corante (KAMMRADT, 2004; CAMPOS, 2010; OLIVEIRA, 2010).

O reagente de Fenton (H_2O_2 - sais de ferro II) é baseado na formação de compostos oxidantes reativos com capacidade de degradar corantes. As vantagens deste processo estão na redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO), cor e toxicidade. Entretanto, como o mecanismo envolve a floculação do reagente com as moléculas de corante, as impurezas são transferidas do efluente para o lodo, o qual é ainda ambientalmente questionável (KAMMRADT, 2004; CAMPOS, 2010; OLIVEIRA, 2010).

O ozônio é um bom agente oxidante devido ao seu potencial de oxidação maior ($E^\circ = 2,07$), comparado com o cloro ($E^\circ = 1,36$) e o H_2O_2 ($E^\circ = 1,78$). A oxidação por ozônio é capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos. A quantidade de ozônio aplicada ao efluente depende da cor e da DQO a ser removida. Dentre as vantagens está o fato de a ozonização deixar o efluente sem cor e com baixa DQO, sem resíduos ou geração de lodo, uma vez que o mesmo pode ser aplicado em estado gasoso e, portanto não aumenta o volume da água residual e do lodo. A desvantagem desse método é o curto tempo de meia vida do ozônio, geralmente, 20 minutos. Este tempo ainda pode ser menor se a estabilidade for afetada pela presença de sais, pelo pH e pela temperatura. Isso demanda contínua reposição do ozônio, o que aumenta o custo do processo (KAMMRADT, 2004; DAMINELLI, 2008; CAMPOS, 2010; OLIVEIRA, 2010).

3.3.2 Métodos Biológicos

Os tratamentos biológicos convencionais, como lodos ativados, lagoas de estabilização, entre outros, são muito utilizados no tratamento de águas residuais, pois reúnem baixo custo e fácil operação. Eles normalmente são eficientes na remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos, mas não na redução de cor, pois os corantes são compostos resistentes à biodegradação por sistemas convencionais (KAMMRADT, 2004; OTTONI, 2012).

Devido ao fato de processos biológicos convencionais não alcançarem a eficiência necessária na remoção de cor, é que outros métodos vêm sendo estudados. Os métodos biológicos não convencionais são considerados benéficos ao meio ambiente, uma vez que podem causar a completa mineralização de poluentes orgânicos a baixo custo, por isso apresentam grande interesse industrial (KAMMRADT, 2004; CAMPOS, 2010; OTTONI, 2012).

Os estudos de biodegradação de corantes tem se concentrado em bactérias e fungos, principalmente em fungos ligninolíticos, demonstrando a parcial ou completa biodegradação através destes microrganismos. Estes microrganismos são de fácil manipulação, possuem rápida velocidade de crescimento e alta capacidade de adaptação (OTTONI, 2012; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Os fungos são organismos apropriados para tratar efluentes e têm sido muito estudados. Eles têm uma vantagem em comparação às bactérias, graças à produção de enzimas extracelulares que oxidam os substratos (OTTONI, 2012).

O uso de fungos, como *Phanerochaete chrysosporium* e *Tinctoporia* sp., na degradação de polpa contendo lignina e efluentes das indústrias de papel começou no início dos anos 1980. Além do *P. chrysosporium*, outros fungos ligninolíticos estudados obtiveram a capacidade de degradar corantes, incluindo *Trametes versicolor*, *Coriolus versicolor* e *Ceriporiopsis subvermispota*. Os resultados positivos obtidos em diversas pesquisas fizeram dos fungos, especialmente os fungos basidiomicetos de podridão branca, os microrganismos mais conhecidos e aplicados na degradação de corantes sintéticos (CAMPOS, 2010; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

3.4 FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

Os fungos são organismos eucarióticos, quimioheterotróficos, predominantemente aeróbicos ou fermentadores facultativos, extremamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos, podendo apresentar-se sob a forma de leveduras, formando pseudomicélio ou constituindo hifas. Como possuem crescimento rápido e ciclo de vida curto, podem ser cultivados em pequenos espaços, sob condições controladas, com alta produção de biomassa (CONCEIÇÃO, 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos são responsáveis por diversas ações benéficas. Eles são importantes na produção de ácidos orgânicos, alimentos, bebidas, fármacos e enzimas de interesse industrial, como lacases, pectinases, celulasas, amilases e xilanases (CONCEIÇÃO, 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Eles são os principais decompositores de celulose e lignina, componentes da madeira. Devido a essa característica os fungos são extensivamente pesquisados e estudados, com o intuito de serem utilizados na degradação de diversos tipos de compostos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; OTTONI, 2012).

Dentre os fungos mais estudados encontram-se muitas espécies de basidiomicetos, comumente conhecidos como cogumelos e orelhas de pau, fungos terrestres e amplamente encontrados na natureza. Os fungos, em especial os basidiomicetos, são organismos adequados para o tratamento de efluentes, principalmente pelo fato de produzirem enzimas oxidativas extracelulares. Sendo que, grande parte dessas enzimas são inespecíficas, ou seja, possuem a capacidade de interagir com os mais diversos tipos de substratos. O micélio fúngico, causa a solubilização de compostos insolúveis por meio da produção dessas enzimas extracelulares. Assim, pode-se destacar os estudos que englobam enzimas ligninolíticas, as quais são produzidas a partir de culturas de fungos da podridão branca da madeira (QUADROS, 2005; SILVA; COELHO, 2006; SILVA; ESPOSITO, 2010; OTTONI, 2012).

Os fungos decompositores de madeira podem ser separados em três grupos diferentes, de acordo com a morfologia da decomposição: fungos de podridão branca (*white-rot fungi* – degradam todos os componentes da madeira), podridão parda/castanha (*brown-rot fungi* – degradam principalmente polissacarídeos) e podridão branda/mole (*soft-rot fungi* – degradam lignina e polissacarídeos, mas em velocidades muito baixas) (CARDOSO, 2009; CONCEIÇÃO, 2010; FERRAZ, 2010).

Os fungos de podridão branca pertencem a um grupo bastante heterogêneo. Tais fungos são capazes de degradar todos os constituintes da madeira, mas o modo, a ordem e taxa com que atacam esses constituintes variam de acordo com a espécie (ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Os basidiomicetos da podridão branca são os mais eficientes na biodegradação de poluentes com estrutura similar à da lignina, pois são os únicos microrganismos capazes de degradar eficientemente e mineralizar a lignina a CO₂ e água. Eles possuem a habilidade de oxidar os compostos fenólicos através das enzimas ligninolíticas extracelulares produzidas, principalmente as lacases (CARDOSO, 2009; CONCEIÇÃO, 2010; ORTIZ-MONSALVE, 2015).

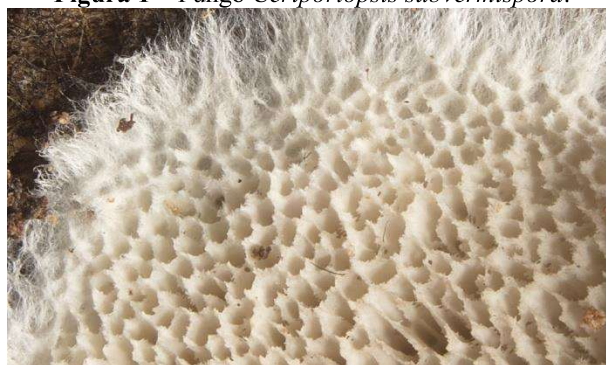
Sendo assim, os fungos da podridão branca e suas enzimas ligninolíticas tem um importante papel em vários processos biotecnológicos, desde a indústria alimentícia até tratamentos para a biodegradação de compostos (ORTIZ-MONSALVE, 2015).

3.4.1 O fungo *Ceriporiopsis subvermispora*

O fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, Figura 1, é um basiomiceto da família Polyporaceae, a qual possui várias espécies muito estudadas, como os fungos *Trametes*

versicolor e *Phanerochaete chrysosporium*, principalmente pela produção de lacase, lignina-peroxidase (LiP) e manganês-peroxidase (MnP). Sendo essas as principais enzimas do sistema de degradação da lignina, produzidas por basidiomicetos de podridão branca (GARCIA, 2006; GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Figura 1 – Fungo *Ceriporiopsis subvermispora*.



Autor: (Pilát) Gilb. & Ryvarden (2013).

Vale ressaltar que nem todos os fungos ligninolíticos produzem todas essas enzimas, podendo haver combinações diferentes para cada espécie. Dentre as enzimas extracelulares produzidas pelo *C. subvermispora* destacam-se as lacases e as MnPs. Uma vez que a presença de LiPs não tem sido observada nos mais distintos meios de cultivo já estudados até o momento. Além dessas enzimas principais, o fungo também produz o complexo xilanolítico completo e algumas enzimas pertencentes ao complexo celulolítico como, as exo-celulases em pequenas quantidades e, as endocelulases e β -glicosidases nas mesmas quantidades produzidas por outros fungos da podridão branca. Assim como em outros basidiomicetos, a síntese dessas enzimas vai depender do substrato (MACEDO, 2006; FERRAZ, 2010).

Os fungos pertencentes ao gênero *Ceriporiopsis* são conhecidos por serem eficientes na degradação da lignina em madeiras. Mas o sistema enzimático extracelular utilizado pelo *Ceriporiopsis subvermispora* para decompor a lignina ainda não é muito bem esclarecido. Alguns autores levantam a questão se o fungo realmente não produz a LiP, ou se a enzima só é produzida em meio sólido lignocelulósico, no qual fica inviável a determinação experimental de LiP, pois a quantificação da enzima nos extratos seria mascarada pela presença de contaminantes. Essa dúvida se dá pelo fato de já existirem estudos mostrando que *C. subvermispora* possui genes homólogos aos que expressam a LiP em *P. chrysosporium* (MACEDO, 2006; FERRAZ, 2010).

O *C. subvermispora* tem grande importância na aplicação industrial de biopolpação. Entretanto, há uma tendência crescente de seu emprego em outros processos biotecnológicos, como na degradação de corantes presentes em águas residuais (MACEDO, 2006).

3.5 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

A maioria das enzimas são proteínas, com exceção de poucas moléculas de RNA catalítico. As enzimas são moléculas que atuam como catalisadores biológicos conduzindo centenas de reações bioquímicas nas células dos organismos vivos. Elas possuem um alto poder catalítico, devido sua capacidade de acelerar as reações químicas, e alto grau de especificidade para seus substratos. Além disso, são dependentes de condições específicas de temperatura e pH, para que possam atuar na sua melhor forma (NELSON; COX, 2011).

Algumas enzimas são obtidas de tecidos animais e vegetais, mas os biocatalisadores de interesse industrial, geralmente, são produzidos por microrganismos. Elas podem ser intracelulares ou extracelulares. Devido ao crescimento da utilização de enzimas em processos industriais muitas pesquisas têm sido feitas em busca de novas enzimas e novos organismos produtores (BON et al., 2008).

Os fungos basidiomicetos de podridão branca possuem dois sistemas exoenzimáticos, que produzem enzimas extracelulares: o hidrolítico, que promove a hidrólise de polissacarídeos, e o oxidativo, que faz a degradação da lignina. Sendo que o sistema oxidativo sintetiza três enzimas primordiais à degradação de lignina, são elas: a LiP, a MnP e a lacase, que são as mais estudadas. Tais enzimas oxidativas atuam sobre as partes fenólicas e/ou não fenólicas da lignina, causando a sua degradação (CARDOSO, 2009).

O uso dessas enzimas ligninolíticas não está atrelado somente à degradação de lignina, pois por serem enzimas de baixa especificidade e alto poder oxidativo, podem ser utilizadas para degradar diversos tipos de poluentes ambientais, como os corantes presentes em águas residuais e solos contaminados com organopoluentes (CARDOSO, 2009).

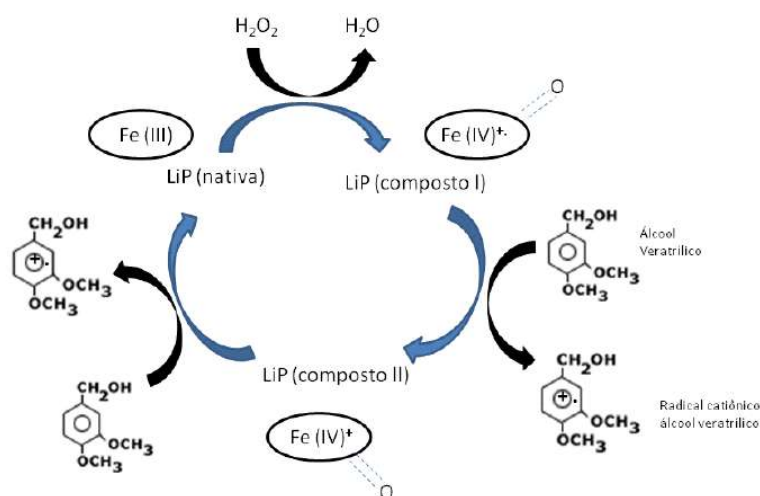
A capacidade desses fungos de degradar outros compostos, como os corantes, está principalmente ligada à atividade das enzimas extracelulares pertencentes aos grupos das peroxidases (LiP e MnP) e as fenol-oxidases (lacases) (NASCIMENTO, 2008).

3.5.1 Lignina-Peroxidase (LiP)

A lignina-peroxidase (EC 1.11.1.14), inicialmente chamada de ligninase, foi identificada pela primeira vez no microrganismo *Phanerochaete chrysosporium*. Essa enzima é uma glicoproteína extracelular que contém um grupo prostético heme (ferroprotoporfirina IX), e é capaz de degradar unidades fenólicas e não fenólicas de uma enorme variedade de compostos resistentes ao ataque microbiano, incluindo a lignina (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009).

Sua atividade catalítica, Figura 2, necessita da presença de H_2O_2 como cofator para gerar um radical cátion com alto potencial redox capaz de retirar um elétron do anel aromático, dando origem a radicais catiônicos aromáticos que causam a desestruturação do substrato. Este tipo de mecanismo causa a oxidação de álcoois benzílicos; quebra de cadeias aromáticas laterais; quebra de anéis aromáticos em compostos não fenólicos, entre outros (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009).

Figura 2 – Ciclo catalítico da lignina-peroxidase (LiP).



Fonte: Faria (2010).

No ciclo catalítico da LiP, Figura 2, o ferro (Fe) presente no grupo heme (ferroprotoporfirina IX) da LiP sofre algumas oxidoreduções. Primeiramente o Fe (III) presente no grupo heme da LiP (nativa) é oxidado a Fe (IV) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um aceptor natural de elétrons, formando H_2O e o LiP (composto I) oxidado, radical catiônico da LiP deficiente em dois elétrons. Sendo que, o composto I gerado é capaz de oxidar a lignina e compostos similares. Em seguida, o LiP (composto I) é reduzido por meio da transferência de um elétron, na presença de um agente redutor como o álcool veratrílico,

formando o LiP (composto II), no qual o Fe (IV) não é mais um radical livre. Então, a enzima volta à condição LiP (nativa) através de uma segunda redução, com a transferência de um elétron doado por um outro agente redutor, completando assim o ciclo (FARIA, 2010).

O álcool veratrílico (3,4 dimetoxibenzil), sintetizado em alta concentração por vários fungos de podridão branca, é normalmente empregado nos ensaios de atividade de LiP onde, na presença de H_2O_2 , ocorre a formação do veratraldeído (produto oxidado). O álcool veratrílico possui um importante papel no processo catalítico da LiP, pois é o redutor preferido por essa enzima, sendo sintetizado pelo fungo da podridão branca depois da lignólise, e protege a LiP da inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009).

Ollikka et al. (1993) analisaram o uso de LiP de *Phanerochaete chrysosporium* na degradação de dez diferentes tipos de corantes sintéticos (azul de bromofenol, vermelho congo, azul de metileno, verde de metila, alaranjado de metila, remazol brilliant blue R (RBBR), azul de toluidina, Poly S-119, Poly R-478 e Poly T-128), através do extrato enzimático bruto. A maioria dos corantes perdeu mais de 75% de sua cor, apenas vermelho Congo, Poly R-478 e Poly T-128 obtiveram degradação menor do que os outros, 54, 46 e 48%, respectivamente. Neste mesmo estudo foi observada a capacidade de três isoenzimas purificadas em degradar os corantes (LiP 4,65, LiP 4,15 e LiP 3,85). As isoenzimas foram capazes de descolorir os corantes na presença de um mediador (álcool veratrílico), de forma comparável ao extrato enzimático bruto, confirmando que a LiP é capaz de degradar corantes. Entretanto, na ausência do mediador, a atividade de degradação das isoenzimas foi, na maioria dos casos, drasticamente reduzida.

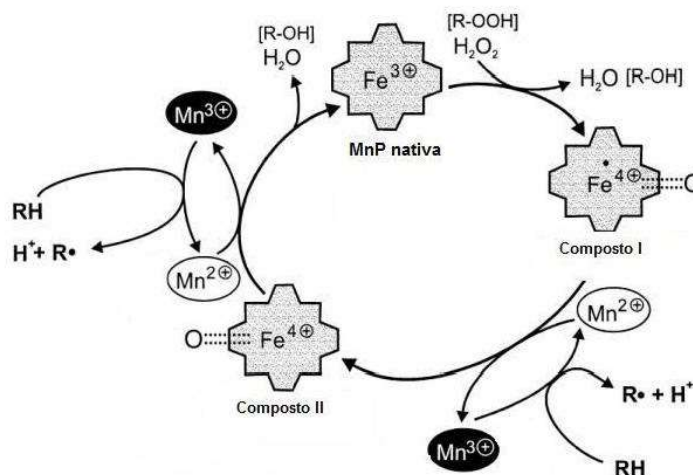
Leitão, Carvalho e Bon (2007) avaliaram o uso de LiP de *Phanerochaete chrysosporium* na degradação do corante azul de metileno, através do extrato enzimático bruto. Em misturas reacionais contendo $50mg.L^{-1}$ do corante, realizadas a $30^{\circ}C$, o mesmo foi degradado em 30 minutos. As condições de degradação foram otimizadas quando adicionado H_2O_2 para minimizar o custo e a temperatura da reação. Os resultados mostraram que usando uma razão molar corante: H_2O_2 de 1:5 houve uma remoção eficiente de 90% da cor.

3.5.2 Manganês-Peroxidase (MnP)

A manganês-peroxidase (EC 1.11.1.13), assim como a LiP, é uma glicoproteína extracelular hêmica e necessita da presença de H_2O_2 para sua atividade. Seu ciclo catalítico, Figura 3, necessita de H_2O_2 e Mn^{+2} , sendo esse oxidado a Mn^{+3} que, consequentemente, oxida

o substrato de interesse. A estabilidade do Mn^{+3} é garantida através do uso de ácidos orgânicos, como o lactato, o oxalato e o malato, que agem como quelantes e formam um complexo oxidante ativo (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009).

Figura 3 – Ciclo catalítico da manganês-peroxidase (MnP).



Fonte: Faria (2010).

O ciclo catalítico da MnP, Figura 3, é similar ao da LiP, mas diferencia-se do ciclo da LiP devido a necessidade do íon Mn^{+2} para que o ciclo se complete. O ciclo catalítico da MnP inicia-se com a oxidação da MnP nativa pela ligação do H_2O_2 ou de um peróxido orgânico ao íon Fe^{+3} , formando H_2O e o composto I, o qual é deficiente em dois elétrons. Então, o íon Mn^{+2} ou outro doador de elétron com potencial redox adequado transfere um elétron para o composto I, levando a formação do composto II. Na sequência, o composto II recebe um elétron de outro íon Mn^{+2} , especificamente, e retorna à forma MnP nativa. Os íons Mn^{+3} gerados durante o ciclo são estabilizados por ácidos orgânicos, como o oxalato, malonato, tartarato ou lactato (FARIA, 2010).

Os íons Mn^{+3} podem agir como mediadores de baixa massa molar, o que faz com que a MnP seja responsável por grande parte da degradação de lignina, pois a transferência de seu poder oxidante para um mediador facilita a difusão e o ataque através da parede de lignina (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009).

A MnP age principalmente em compostos fenólicos, mas a oxidação de substratos não fenólicos também pode acontecer. Os íons Mn^{+3} atacam compostos orgânicos de forma inespecífica, pela abstração de elétrons, o que leva a formação de radicais reativos capazes de degradar compostos recalcitrantes, orgânicos sulfurados, aminas aromáticas e fenóis (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; CARDOSO, 2009; FARIA, 2010).

Urek e Pazarlioglu (2007) avaliaram a produção de MnP pelo fungo de *Phanerochaete chrysosporium*, monitorando seu crescimento em diferentes meios e condições de cultivo, na presença e ausência de alguns indutores, como Mn^{2+} e Tween 80. Os cultivos suplementados com Tween 80 (0,05% v/v) e Mn^{2+} (174 μ M) resultaram em uma atividade máxima de MnP de 356 U/L, aproximadamente duas vezes maior a obtida no cultivo controle (sem Tween 80). Os corantes sintéticos Direct Blue 15 e Direct Green 6 (50mg.L⁻¹) foram tratados com a MnP produzida, em pH 4,5 a 30°C. A degradação obtida para Direct Blue 15 foi 12% e 5,4% para Direct Green 6, após 5 minutos de tratamento. Os resultados comprovam a capacidade de MnP, produzida por *P. chrysosporium*, em descolorir corantes.

A MnP apresenta potencial aplicação biotecnológica podendo ser utilizada na biodegradação de lignina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA), ácidos húmicos, corantes sintéticos e bifenilas policloradas (PCB) (OTTONI, 2012).

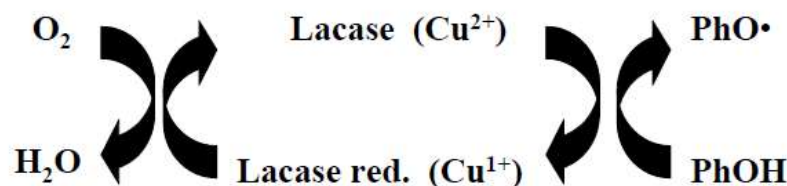
3.5.3 Lacase

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas pertencentes à classe das fenol-oxidases que possuem quatro átomos de cobre (Cu) em seu sítio ativo, classificados em três tipos (um átomo T1, um T2 e dois T3), por isso são conhecidas como enzimas multi-cobres. Podem ser divididas principalmente em dois grupos de acordo com sua origem: plantas e fungos. As lacases fúngicas possuem massa molar entre 60 e 100kDa e, geralmente, podem se apresentar na forma de 5 ou mais isoenzimas, dependendo da espécie do fungo e das condições de crescimento (TAVARES, 2006; VILLELA, 2006; CARDOSO, 2009; FARIA, 2010).

Segundo Villela (2006) e Tavares (2006) essa enzima foi descoberta por Yoshida em 1883, em uma planta, a *Rhus vernicifera*, e caracterizada por Bertrand em 1985 como uma oxidase de cobre. Mas sua atividade já foi observada em mais de 60 tipos diferentes de fungos, em diversas plantas superiores e em algumas bactérias.

As lacases catalisam a oxidação de um elétron de substratos tais como: os mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas, ao mesmo tempo em que reduz quatro oxigênios moleculares (O₂) a água. Seu ciclo catalítico, Figura 4, envolve transferências de elétrons sequenciais entre os átomos de cobre (VILLELA, 2006; NASCIMENTO, 2008; CARDOSO, 2009).

Figura 4 – Ciclo catalítico da lacase, onde PhOH representa um composto fenólico.



Fonte: Mendes (2008).

A reação de oxidação catalisada pelas lacases, Figura 4, começa com a retirada de um elétron do substrato fenólico (PhOH) formando um fenoxi-radical ($PhO\bullet$). À medida que ocorre a oxidação dos substratos pela enzima, os átomos de Cu^{2+} vão se reduzindo a Cu^{1+} . Em seguida, o Cu^{1+} reduzido é reoxidado através da redução do O_2 a água, então o ciclo recomeça. Além disso, a lacase também pode oxidar compostos com alto potencial redox na presença de mediadores apropriados, como o ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazol-6-sulfônico)), 1-hidroxibenzotriazol e ácido 3-hidroxiantranílico. Após sua oxidação a radicais catiônicos, o mediador é capaz de oxidar compostos com elevado potencial redox, por exemplo, os compostos não fenólicos da lignina (CRUZ JÚNIOR, 2003; VILLELA, 2006; NASCIMENTO, 2008; CARDOSO, 2009; FARIA, 2010).

A atividade da lacase tem sido observada em muitas espécies fúngicas. Essa enzima já foi purificada a partir de muitas espécies. Entretanto, existem alguns grupos taxonômicos ou fisiológicos de fungos que não produzem quantidades significativas de lacase. Por exemplo, a produção de lacase nunca foi observada em fungos inferiores, como *Zygomycetes* e *Chytridiomycetes*, mas estes grupos ainda não foram estudados com detalhes. As lacases são típicas de basidiomicetos, que causam a podridão branca, sendo que quase todas as espécies de fungos desse grupo produzem lacase. Os fungos produtores de lacase mais comuns são do gênero *Trametes*, como o *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *T. villosa*, entre outros (BALDRIAN, 2006; MADHAVI; LELE, 2009).

A utilização de lacases em processos biotecnológicos desponta como uma alternativa promissora. Uma vez que têm sido cada vez mais estudadas para a utilização na biotransformação de compostos fenólicos em geral, inclusive no tratamento de efluentes que possuem tais compostos. Além dos estudos envolvendo o uso de lacases no tratamento de efluentes, existem pesquisas evidenciando o potencial dessa enzima em processos de polpação. Processo no qual a enzima age no branqueamento da polpa substituindo o uso de cloro (CRUZ JÚNIOR, 2003; VILLELA, 2006).

Segundo estudos, essa enzima também tem a capacidade de degradar uma grande variedade de corantes sintéticos, como o cristal violeta, vermelho congo, verde malaquita,

azul de bromofenol, podendo então ser utilizada no tratamento de águas residuais da indústria têxtil e demais indústrias químicas que fazem uso de corantes (MAYER; STAPLES, 2002; TAVARES, 2006; VILLELA, 2006).

3.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Para que haja uma otimização na produção dessas enzimas alguns fatores devem ser controlados, como concentração do inóculo, a forma de crescimento do fungo, composição do meio de cultivo, pH, temperatura, frequência de agitação do meio, presença de indutor e ausência de inibidores, entre outros fatores (AGUIAR, 2006; TAVARES, 2006; VILLELA, 2006; NASCIMENTO, 2008).

3.6.1 Meio De Cultivo

O meio de cultivo é um fator importante a ser considerado na produção de enzimas, uma vez que sua composição interfere diretamente no desenvolvimento do microrganismo produtor, afetando desde o seu crescimento até a síntese da enzima. Os meios de cultivo podem ser classificados de acordo com sua composição e o seu estado físico (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

De acordo com sua composição, podem ser divididos em naturais e sintéticos. Os meios naturais são caracterizados por sua composição quantitativa desconhecida, uma vez que são compostos por fontes de origem animal ou vegetal, como grãos, sementes, raízes e folhas. Dessa forma, esse tipo de meio é pouco reprodutível, uma vez que apresenta grande variação em sua composição e vários fatores podem interferir no seu controle. Já os meios sintéticos, são conhecidos por ter composição qualitativa e quantitativa conhecidas, assim como os meios semissintéticos. Sendo que, nos meios semissintéticos, parte dos componentes são naturais, como o extrato de malte e de levedura (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

A composição de um meio de cultivo inclui microelementos/elementos-traço, macroelementos e fatores de crescimento, sendo que os macroelementos são encontrados em maior quantidade, enquanto os demais componentes correspondem a uma menor parte da composição de um meio (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Dentre os macroelementos mais importantes encontra-se o carbono (45% a 55%), essencial para o metabolismo de todo ser vivo. Os fungos, por serem heterotróficos, necessitam de carbono advindo de fonte externa, por isso o meio deve possuir determinada

quantidade de carbono disponível. Outro composto muito importante é o nitrogênio (12% a 16%), encontrado em proteínas e ácidos nucleicos, eles fazem parte de vários metabólitos gerados pelos fungos, como hormônios e antibióticos. Uma relação C/N equilibrada é extremamente necessária, para que a fermentação ocorra satisfatoriamente. Os demais macroelementos essenciais para um fungo são o oxigênio (16% a 22%), o hidrogênio (7% a 10%), o fósforo (1% a 2%) e o enxofre (0,4% a 0,8%) (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Os microelementos/elementos-traço agem como cofatores enzimáticos e reguladores osmóticos, além de serem importantes para a transferência de elétrons em reações de oxido-redução. Já os fatores de crescimento são vitaminas, moléculas orgânicas que têm ação catalítica específica como coenzimas em reações enzimáticas (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

A classificação em função do estado físico é dividida em meios sólidos e meios líquidos. Os meios sólidos, normalmente, são compostos por ágar-ágar, um polissacarídeo que confere ao meio a capacidade de se solidificar quando resfriado a uma temperatura entre 32°C e 45°C. Esse tipo de meio é, muitas vezes, utilizado para detectar contaminantes e estudar as colônias de microrganismos. Mas, também podem ser compostos por uma matriz sólida com pouca ou nenhuma presença de água livre, como na fermentação em estado sólido. Já os meios líquidos, são aqueles onde os nutrientes se encontram dissolvidos ou suspensos em água, como na fermentação submersa (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010; ZANCHETTA, 2012).

Na fermentação em estado sólido (FES), a matriz sólida deve ter umidade suficiente para manter o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser natural (fonte de carbono e outros nutrientes), como resíduos agroindustriais, ou ser constituída de um suporte inerte com meio líquido adsorvido. A FES tem como vantagens o uso de resíduos como substrato, baixo consumo de energia e de água, além de simular condições de vida dos microrganismos que crescem em materiais sólidos na natureza, como os fungos filamentosos. Dentre as desvantagens desse processo encontram-se as diferenças nos gradientes de temperatura, umidade e concentração de substrato, a dificuldade de determinar o crescimento do microrganismo e controlar os parâmetros de produção, o que interfere na padronização do processo e limita a reprodução dos resultados (AFONSO, 2012; ZANCHETTA, 2012; ESCARAMBONI, 2014).

Na fermentação submersa (FS), os microrganismos se desenvolvem em meio líquido, o que facilita o controle da aeração, a quantificação do crescimento dos microrganismos e a

recuperação dos metabólitos de interesse produzidos e excretados. Mas, a quantidade de água presente facilita a contaminação por outros microrganismos indesejáveis. A FS é o processo mais utilizado para produzir enzimas comerciais, devido à facilidade de controle da produção, o que o torna mais confiável e reproduzível. Entretanto, o elevado volume de resíduos líquidos produzidos e o custo de operação encarecem o processo (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010; ZANCHETTA, 2012; ESCARAMBONI, 2014).

Os cultivos de *C. subvermispora* são diretamente afetados pelo tipo e composição do meio, uma vez que o mesmo pode induzir ou não a produção e liberação das enzimas MnP e lacase (FARIA, 2010).

3.6.2 Indutor

Para que a utilização de enzimas seja viável em um processo, é necessário que sua produção seja em quantidades consideráveis. Para tanto, muitos pesquisadores tem buscado alternativas para a maximização da produção de MnP e lacase, entre elas a utilização de compostos indutores no meio de cultivo. Muitas vezes esse composto indutor é o próprio substrato a ser degradado pela enzima ou alguma molécula de estrutura similar ao substrato (TAVARES, 2006).

A utilização de indutores no cultivo de basidiomicetos tem sido feita com sucesso, uma vez que esses compostos podem promover a síntese de isoformas de enzimas ligninolíticas, causando um aumento significativo na produção. Essas enzimas são induzidas por diversos compostos aromáticos e íons metálicos (TAVARES, 2006; FARIA, 2010).

Para a lacase, geralmente, os indutores mais utilizados são os compostos aromáticos, devido as suas características estruturais, como o 2,5-xilidina e o álcool veratrílico. Além desses, outros compostos muito utilizados são o etanol e o cobre (FARIA, 2010; MOREIRA NETO, 2012).

O cobre estimula a transcrição da enzima e aumenta a atividade da mesma. O aumento da transcrição está relacionado com a regulação da expressão gênica causada por esse elemento (GALHAUP et al., 2002; TAVARES, 2006; MOREIRA NETO, 2012).

Para que a indução pelo cobre ocorra de forma satisfatória alguns parâmetros são fundamentais, dentre eles a concentração do elemento e o estágio de adição do mesmo. Uma vez que, dependendo da concentração, o cobre pode interagir com grupos -SH da enzima e com isso causar inibição da mesma. De uma forma geral, a indução por cobre é feita através

da adição de sulfato de cobre (CuSO_4) ao meio de cultivo, no terceiro ou quarto dia após o início do cultivo, na fase exponencial do cultivo (MOREIRA NETO, 2012).

Galhaup e Haltrich (2001) adicionaram CuSO_4 ao meio de cultivo de *Trametes pubescens*, variando a concentração entre 0,1mM a 2mM, após a inoculação, no quarto e oitavo dia. A maior atividade da lacase foi observada no quarto dia, na concentração de 2mM de CuSO_4 , quando a concentração de glicose já havia diminuído consideravelmente.

Já para a MnP o indutor mais utilizado é o íon Mn^{2+} , sendo a adição do mesmo muito importante para a detecção da enzima em cultivos de *C. subvermispora* e outros fungos, como *T. versicolor* e *P. cryosporium*. A presença de Mn^{2+} no meio de cultivo promove regulação da expressão gênica de MnP e tem participação ativa na transcrição da enzima. *C. subvermispora* é capaz de produzir MnP mesmo na ausência de Mn^{2+} mas, segundo estudos, na falta do íon a enzima produzida permanece intracelular e só é excretada após a adição de Mn^{2+} ao meio de cultivo. Entretanto, existem pesquisas na literatura que evidenciam a produção de MnP em meios contendo íons Cu^{2+} (FARIA, 2010).

Faria (2010) observou que a adição de MnSO_4 ao meio de cultivo definido, com *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano, influenciou a síntese de MnP. Os cultivos foram suplementados com MnSO_4 nas concentrações 0, 11 e 40 ppm, sendo obtida máxima atividade da enzima de $108,5 \text{ UI.L}^{-1}$ no cultivo suplementado com 11 ppm de Mn^{2+} .

A adição de compostos indutores no meio de cultivo aumenta a síntese de enzimas, uma vez que esses compostos podem promover a expressão gênica de MnP e lacase. Portanto, o uso desses compostos é importante para a produção em larga escala dessas enzimas (FARIA, 2010; MOREIRA NETO, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO

Este trabalho foi realizado com o fungo da podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora*, doado pelo professor André Aguiar Mendes (Universidade Federal de Itajubá). O fungo foi mantido em tubos inclinados contendo 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de ágar. Os tubos foram incubados estaticamente em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 7 dias. Em seguida, a cultura foi armazenada em refrigerador.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para a preparação do inóculo, primeiramente a cultura de *C. subvermispora* foi repicada em placas de Petri contendo o meio sólido descrito no tópico 4.1. O micélio crescido no tubo inclinado foi transferido para as placas de Petri. As placas foram incubadas estaticamente em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 7 dias.

Para o crescimento e adaptação do microrganismo em meio líquido, 12 círculos de 1,5cm de diâmetro cada foram retirados das placas contendo o microrganismo, e transferidos para um erlenmeyer de 1000mL contendo 300mL de meio. O meio de adaptação continha de extrato de malte 2% (m/v), de extrato de levedura 0,2% (m/v) e glicose 0,1% (m/v). O cultivo foi mantido estático a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 15 dias, em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação, a biomassa foi recuperada com o auxílio de um funil de Buchner e lavada com água destilada, previamente esterilizada. As células foram trituradas em liquidificador de aço inox estéril, juntamente com água destilada esterilizada, por 3 ciclos de 20 segundos cada.

4.2.1 Massa Seca

Para a determinação da massa de inóculo foi utilizado o método da massa seca. Papel de filtro foi mantido em estufa por 1 hora e 30 minutos a 100°C , até massa constante. O filtro pré-pesado foi utilizado para a filtração de 2mL da suspensão contendo as células e hifas. O filtro contendo as células foi, novamente, mantido em estufa a 100°C até massa constante, e

pesado. A massa de células foi obtida utilizando a Equação 1. A concentração de células na suspensão foi de 30,5mg/mL.

$$\text{concentração de inóculo} = \frac{(\text{massa seca filtro+células}) - (\text{massa seca filtro})}{\text{volume de amostra filtrado}} \quad (1)$$

4.3 FERMENTAÇÃO *Ceriporiopsis subvermispora*

4.3.1 Meio De Cultivo

Para a produção da lacase, foi utilizado meio definido contendo 0,5g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,25g.L⁻¹ de MgSO₄•7H₂O, 0,05g.L⁻¹ de CaCl₂ e 10g.L⁻¹ de glicose. O pH do meio foi ajustado para 4,5, o meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. A glicose foi autoclavada separadamente do restante do meio, para evitar reação de Maillard (escurecimento do meio), e acrescentada ao meio posteriormente (RIBEIRO, 2006).

4.3.2 Condições De Cultivo

O cultivo com *C. subvermispora* para a produção de lacase foi realizado em erlenmeyer de 1000mL, contendo 100mL de meio e 10mL de inóculo. Os cultivos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 28 ± 2°C e 150rpm, por um período de 7 dias.

Paralelamente, foram realizados 6 cultivos em erlenmeyers de 250mL, para o controle da produtividade de lacase. Cada erlenmeyer continha 10mL de meio e 1mL de inóculo. Amostras foram retiradas a cada 3 dias durante 7 dias, para quantificação de lacase.

O fator de indução (Cu²⁺) foi preparado utilizando-se CuSO₄•5H₂O, na concentração 2mM. A solução foi autoclavada a 121°C durante 20 minutos. No terceiro dia dos cultivos, o fator de indução foi adicionado aos mesmos. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para a determinação das atividades enzimáticas, os cultivos foram filtrados em filtro de papel (unifil), com o intuito remover as células do meio de cultivo. O filtrado foi denominado extrato enzimático e utilizado para determinar as atividades enzimáticas.

4.4.1 Manganês-Peroxidase (MnP)

Para determinar a atividade de manganês-peroxidase, 500 μ L do extrato enzimático, 1,5mL tampão succinato de sódio 50mM (pH 5,0), 1,5mL de ácido oxálico 10mM, 500 μ L de MnSO_4 1mM, 500 μ L de vermelho de fenol 0,1% (m/v), 250 μ L de albumina 1% (m/v) e 250 μ L de H_2O_2 2mM foram adicionados a um tubo de ensaio. Dessa mistura, foi retirado 1mL e acrescentado 30 μ L de NaOH 6,5M, a seguir a absorbância foi registrada no comprimento de onda (λ) de 610nm, durante 8 minutos a intervalos de 2 minutos. O branco foi feito substituindo o extrato enzimático por água destilada (CUNHA, 2008).

4.4.2 Lacase

Para o ensaio de determinação de lacase foi utilizado o método de oxidação por ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6)-sulfônico). Juntamente a 500 μ L de extrato enzimático foi adicionado 300 μ L de tampão citrato-fosfato 50mM (pH 5,0), 100 μ L de água destilada e 100 μ L de ABTS 1mM. O branco foi feito substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. A leitura foi realizada no comprimento de onda (λ) de 420nm, por 2 minutos em intervalos de 5 segundos (CUNHA, 2008).

4.4.3 Fenol-Oxidase Total (FOT)

Na determinação da atividade de fenol-oxidase total, o ensaio foi realizado adicionando 500 μ L de extrato enzimático, 300 μ L de tampão citrato 50mM (pH 5,0), 50 μ L de MnSO_4 1mM, 100 μ L de ABTS 1mM e 50 μ L de H_2O_2 2mM. Para o branco, o extrato enzimático foi substituído por água destilada. Foi realizada a leitura no comprimento de onda (λ) de 420nm, por 2 minutos em intervalos de 5 segundos (BALLAMINUT, 2007).

4.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO

Para o estudo de degradação em meio líquido, foram preparadas soluções estoque com concentração 200mg.L⁻¹ para cada um dos corantes: alaranjado de metila, azul de metileno, chromotrope 2R, cristal violeta, índigo carmim, pardo de bismarck Y, preto de eriocromo T, safranina T e vermelho de fenol. Em seguida, foram pipetados 8mL das soluções de corante e colocados em tubos de ensaio. A seguir, 6mL de tampão citrato 50mM (pH 4,5) foram

adicionados. Os tubos de ensaio contendo a solução de corante + tampão citrato foram colocados em banho-maria a 30°C durante 5 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foram acrescentados 2mL do extrato enzimático em cada tubo. Amostras foram retiradas nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas. Os ensaios foram feitos em triplicata, com um controle positivo que continha 8mL de corante, 6mL de tampão citrato e 2mL de extrato enzimático fervido (inativado).

A reação de degradação foi monitorada utilizando a varredura, que foi realizada em espectrofotômetro no modo Wavescan, com um intervalo de comprimento de onda (λ) de 200 a 900nm.

4.6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO EM ÁGAR

Para o estudo de degradação em meio sólido, foram preparadas soluções estoque nas concentrações 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹ para cada um dos corantes: alaranjado de metila, azul de metileno, chromotrope 2R, índigo carmim e vermelho de fenol. O meio sólido continha extrato de malte 2% (m/v), peptona 0,1% (m/v), glicose 2% (m/v) e ágar 2% (m/v). Os meios contendo os corantes foram vertidos em placas de Petri. Após a sua solidificação, foram adicionados ao centro das placas círculos de 1,5cm de diâmetro que foram retirados de placas contendo o *C. subvermispora*, previamente crescido no meio sólido descrito no tópico 4.1. As placas foram incubadas estaticamente em estufa a 30 ± 2°C, por um período de 15 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata, com um controle positivo contendo o corante sem a adição do fungo.

Posteriormente, ao período de incubação, pedaços de 5g do meio sólido foram retirados das placas e adicionado em tubos Falcon, juntamente a 10mL de tampão citrato 50mM pH 4,3. Os tubos foram colocados em estufa bacteriológica a 28 ± 2°C e 180rpm durante 2 horas, para extração do corante. Em seguida, a solução foi centrifugada para retirada da partícula sólida, e o líquido foi submetido a varredura em espectrofotômetro no modo Wavescan, com um intervalo de comprimento de onda (λ) de 200 a 900nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Neste trabalho foi avaliada a produção das enzimas manganês-peroxidase (MnP) e lacase durante a fermentação submersa de *Ceriporiopsis subvermispora*, onde foram analisadas as atividades destas enzimas.

A partir das determinações das atividades enzimáticas descritas no tópico 4.4, foi possível perceber que o fungo *C. subvermispora* foi capaz de produzir as enzimas pertencentes ao grupo das fenol-oxidases, dentre elas a lacase.

Para determinar a concentração de lacase presente no extrato enzimático utilizou-se a Equação 2, descrita por Conceição (2010).

$$UI/L = \frac{\Delta abs \times 10^6}{\varepsilon \times R \times t} \quad (2)$$

Onde, UI/L = atividade enzimática ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$);

Δabs = diferença de absorbância ($A_n - A_0$);

10^6 = $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

ε = coeficiente de absorvidade molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

R = volume de extrato enzimático (mL);

t = tempo de reação (minutos).

Pode-se definir uma unidade de atividade enzimática (1UI) como a quantidade de lacase necessária para oxidar $1\mu\text{mol}$ de ABTS por minuto, sendo o coeficiente $\varepsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (GONÇALVES, 2010).

Na Tabela 2 e 3, é possível observar os valores encontrados para a atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *C. subvermispora*.

Tabela 2 – Atividade enzimática da lacase produzida na fermentação com *C. subvermispora* no ensaio de monitoramento.

Tempo (dias)	Amostra	Δabs	UI.L ⁻¹
3°	1A	1,731	19,33
	1B	1,894	21,04
7°	2A	1,233	13,70
	2B	1,843	20,47

Através dos resultados da Tabela 2 observou-se que não houve aumento significativo na atividade da lacase do terceiro para o sétimo dia. Sendo assim, o cultivo foi interrompido e a atividade enzimática da lacase determinada, e o filtrado livre de células utilizado para o ensaio de degradação, Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade enzimática da lacase produzida na fermentação com *C. subvermispora*.

Amostra	Δabs	U.I.L. ⁻¹
1	1,676	46,55
2	1,669	46,36
3	1,717	47,69
Média -----		46,86 ± 0,7

Faria (2010) estudou a produção de enzimas ligninolíticas por *C. subvermispora* em diferentes meios de cultivo. Em cultivo submerso com meio definido, inoculado com suspensão de micélio fúngico crescido em meio líquido, obteve atividade máxima de lacase de $71,0 \pm 5,7$ U.I.L.⁻¹ no 6º dia de cultivo, enquanto a atividade de MnP foi de $192,0 \pm 28,3$ U.I.L.⁻¹. Rüttimann-Johnson et al. (1993) reportaram 380 U.I.L.⁻¹ para lacase e 600 U.I.L.⁻¹ para MnP, em meio de cultivo definido e condições semelhantes. Já em cultivo submerso com meio complexo, Faria (2010) conseguiu obter atividade máxima de MnP de $69,0$ U.I.L.⁻¹ no 12º dia, enquanto que a atividade de lacase foi $116,5 \pm 50,2$ U.I.L.⁻¹.

Nota-se que a atividade enzimática de lacase obtida neste trabalho, $46,86 \pm 0,7$ U.I.L.⁻¹, foi menor que a atividade descrita na literatura. Essa diferença pode estar associada à composição do meio de cultivo, quantidade de inóculo utilizada e/ou condições de cultivo distintas.

Rüttimann-Johnson et al. (1993) utilizaram 0,45mg/mL de inóculo e o cultivo foi realizado a uma temperatura de 30°C e agitação de 180rpm. Enquanto Faria (2010) usou uma concentração de inóculo de 0,50mg/mL, em condições de cultivo semelhantes à de Rüttimann-Johnson et al. (1993), por um período de 21 dias. Ambos os estudos utilizaram meio de cultivo definido com composição idêntica, contendo glicose, sais minerais e solução de elementos-traço.

As condições de cultivo utilizadas neste trabalho (28°C e 150rpm) foram semelhantes às condições utilizadas nos trabalhos citados acima. Mas, o tempo de cultivo (7 dias) foi menor. Já a concentração de inóculo (30,5mg/mL) foi maior que a utilizada em ambos os estudos mostrados. Entretanto, a composição do meio de cultivo foi diferente, uma vez que o meio de cultivo utilizado neste trabalho não continha solução de elementos-traço.

Provavelmente, a composição do meio de cultivo interferiu na produção das enzimas MnP e lacase, justificando a diferença de atividade encontrada com os trabalhos citados acima.

Dentre as enzimas pertencentes ao grupo das peroxidases produzidas pelo *C. subvermispora* destaca-se a MnP, já que a presença de lignina-peroxidase (LiP) não tem sido observada nos diferentes meios e condições de cultivo já estudados (CUNHA, 2008).

Não foi detectada a atividade da MnP no presente trabalho. Entretanto, tal resultado não era esperado porque segundo a literatura, o *C. subvermispora* é conhecido pela sua capacidade de produzir lacase e MnP.

Gamba et al. (2009) observaram a produção de MnP em meio de composição definida utilizando *C. subvermispora*, obtendo a maior atividade enzimática de $0,192 \pm 0,028$ UI/mL no 18º dia de cultivo, sendo possível observar a produção dessa enzima a partir do 3º dia de cultivo. Nesse mesmo estudo foi observado que a atividade máxima de lacase, $0,071 \pm 0,006$ UI/mL no 6º dia, foi menor que a de MnP.

Muitos estudos têm mostrado que o tipo e a composição do meio, bem como as condições de cultivo influenciam no crescimento fúngico e, conseqüentemente, na síntese de isoenzimas. As características específicas de cada estirpe, a idade do inóculo e a variabilidade genética encontrada entre diferentes cepas de um mesmo fungo também influenciam. Rüttimann et al. observaram diferentes atividades enzimáticas para MnP e lacase em cepas distintas de *C. subvermispora* (RÜTTIMANN-JOHNSON, 1993; SANTOS, 2008, FARIA, 2010; OTTONI, 2012).

Uma alternativa para o aumento da produção das enzimas é a escolha de um meio com uma composição mais favorável e/ou a adição de outro indutor, uma vez que podem promover a síntese de enzimas ligninolíticas, causando um aumento significativo na produção. Segundo Faria (2010) o indutor mais utilizado na síntese de MnP é o íon Mn^{2+} , sendo a adição do mesmo muito importante para a detecção da enzima em cultivos de *C. subvermispora* e outros fungos.

5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO

Para este estudo de degradação utilizou-se o extrato enzimático, meio de cultivo livre de células, produzido pelo fungo *C. subvermispora* em cultivo submerso. Como mostrado no tópico 5.1, dentre as enzimas ligninolíticas, somente a lacase foi produzida e sua atividade foi $46,86 \pm 0,7 \text{ UI.L}^{-1}$.

Nas figuras que se seguem é possível observar as curvas de degradação obtidas durante o ensaio, nos tempos zero, duas, quatro e seis horas após o início, para cada um dos corantes utilizados: alaranjado de metila, azul de metileno, chromotrope 2R, cristal violeta, índigo carmin, pardo de bismarck Y, preto de eriocromo T, safranina T e vermelho de fenol.

Figura 5 – Curva de degradação do corante alaranjado de metila (ALM) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

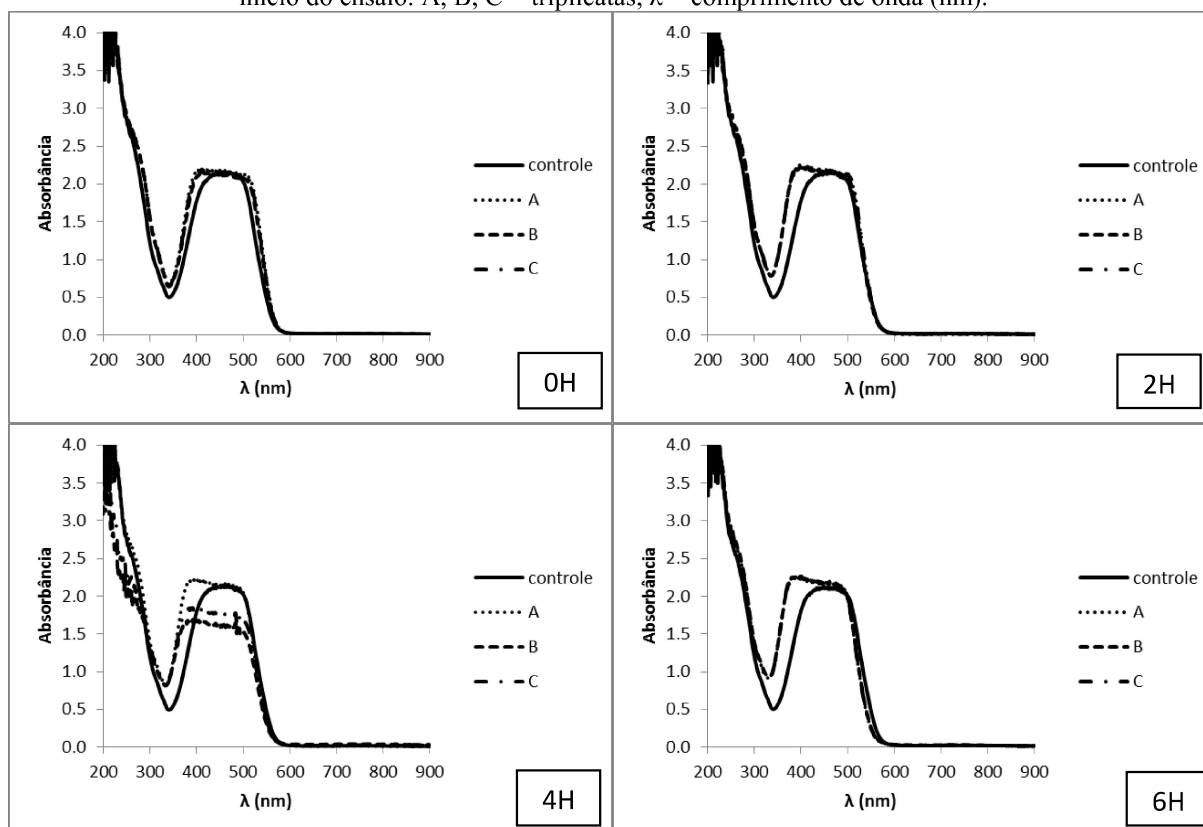


Figura 6 – Curva de degradação do corante azul de metileno (AZM) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

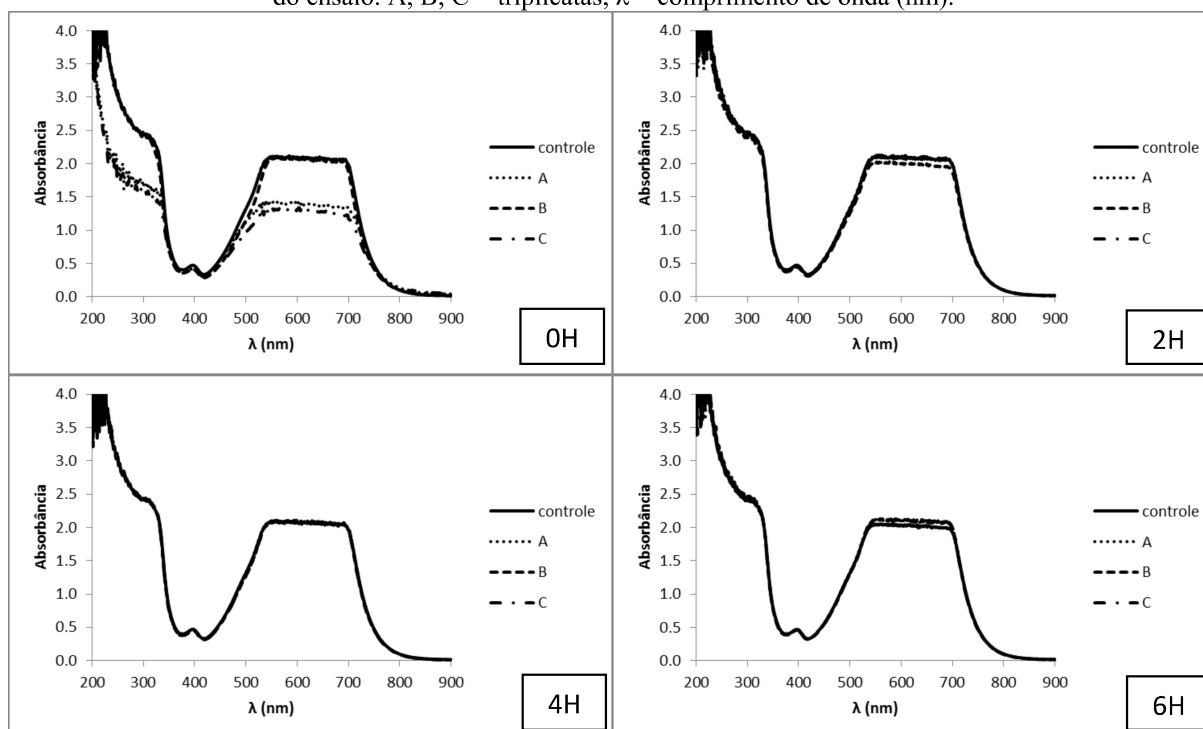


Figura 7 – Curva de degradação do corante chromotrope 2R (C2R) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

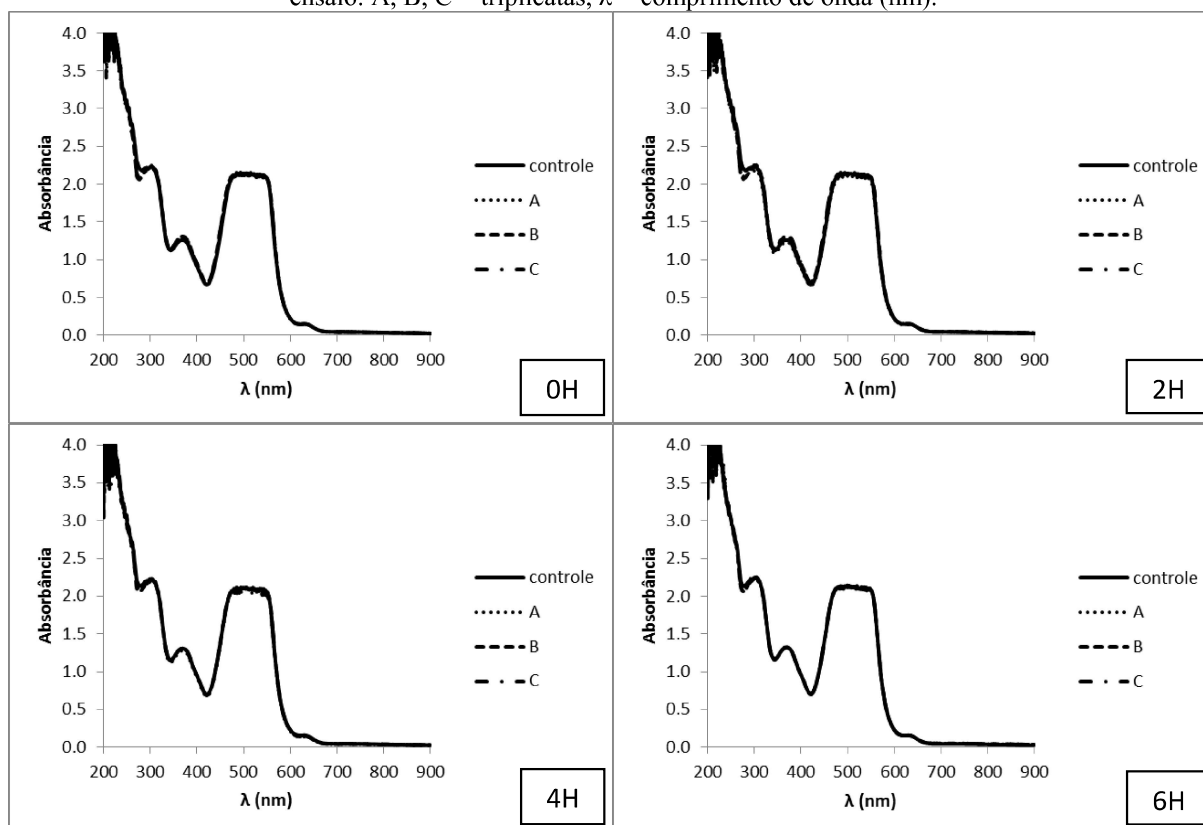


Figura 8 – Curva de degradação do corante cristal violeta (CV) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

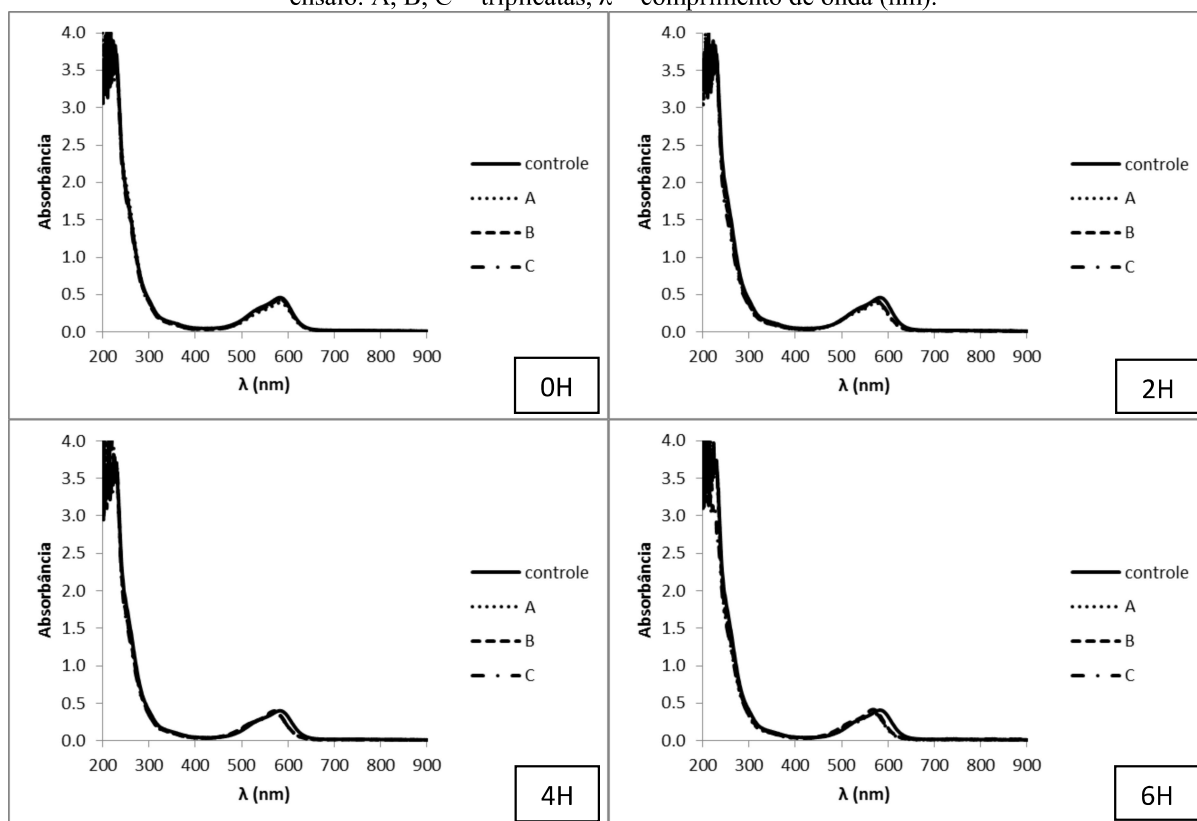


Figura 9 – Curva de degradação do corante índigo carmim (IC) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

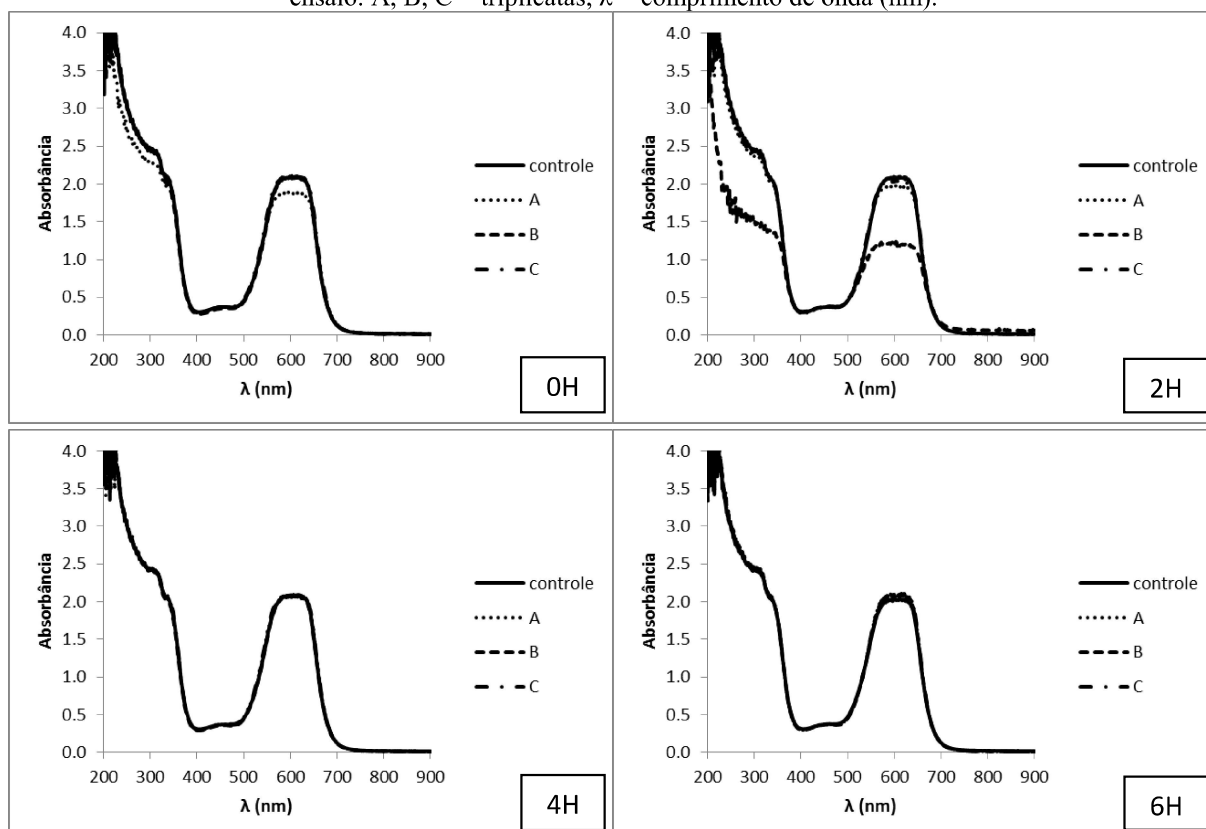


Figura 10 – Curva de degradação do corante pardo de bismarck Y (PBY) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

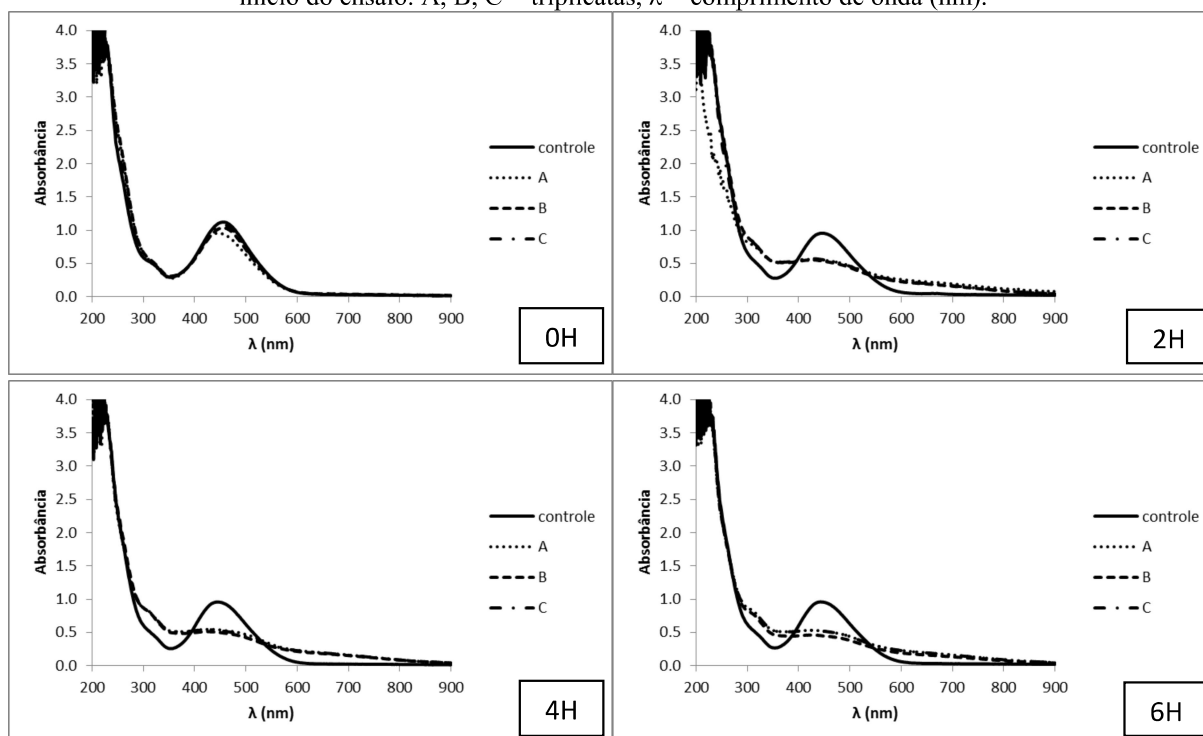


Figura 11 – Curva de degradação do corante preto de eriocromo T (PET) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

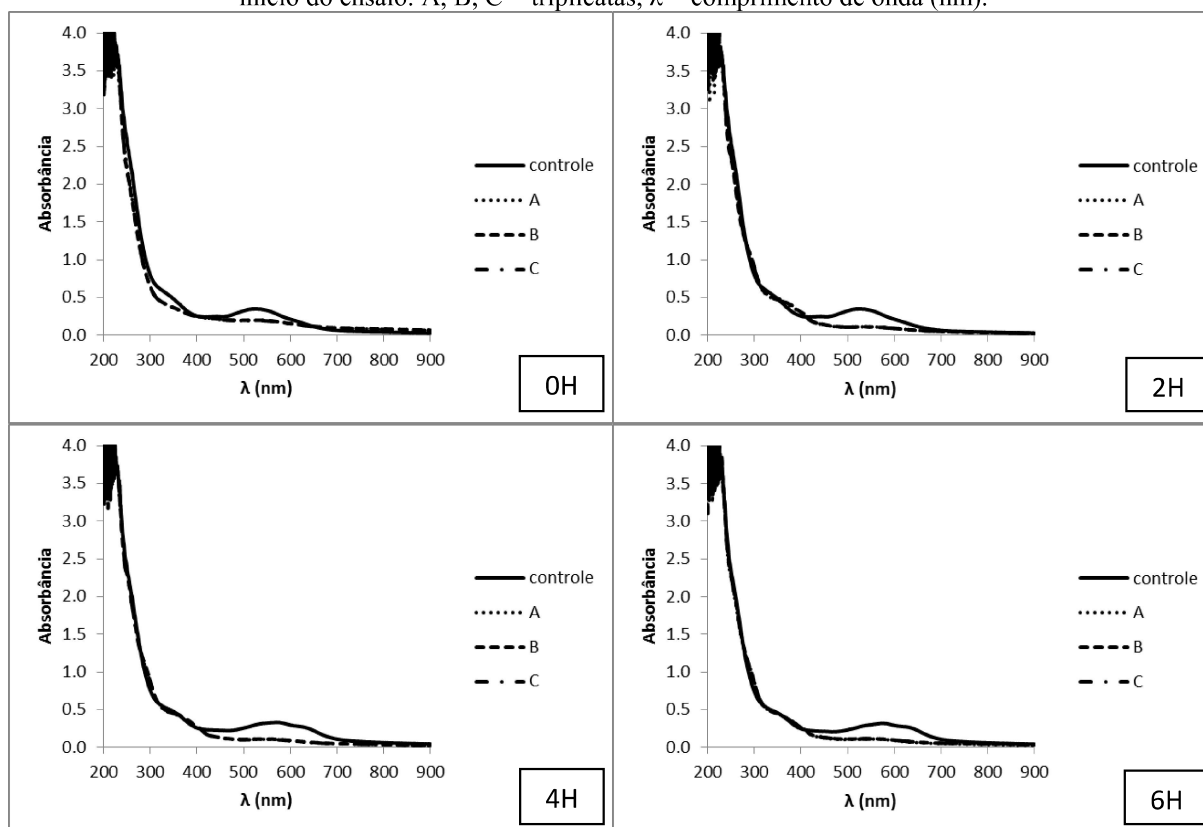


Figura 12 – Curva de degradação do corante safranina T (ST) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

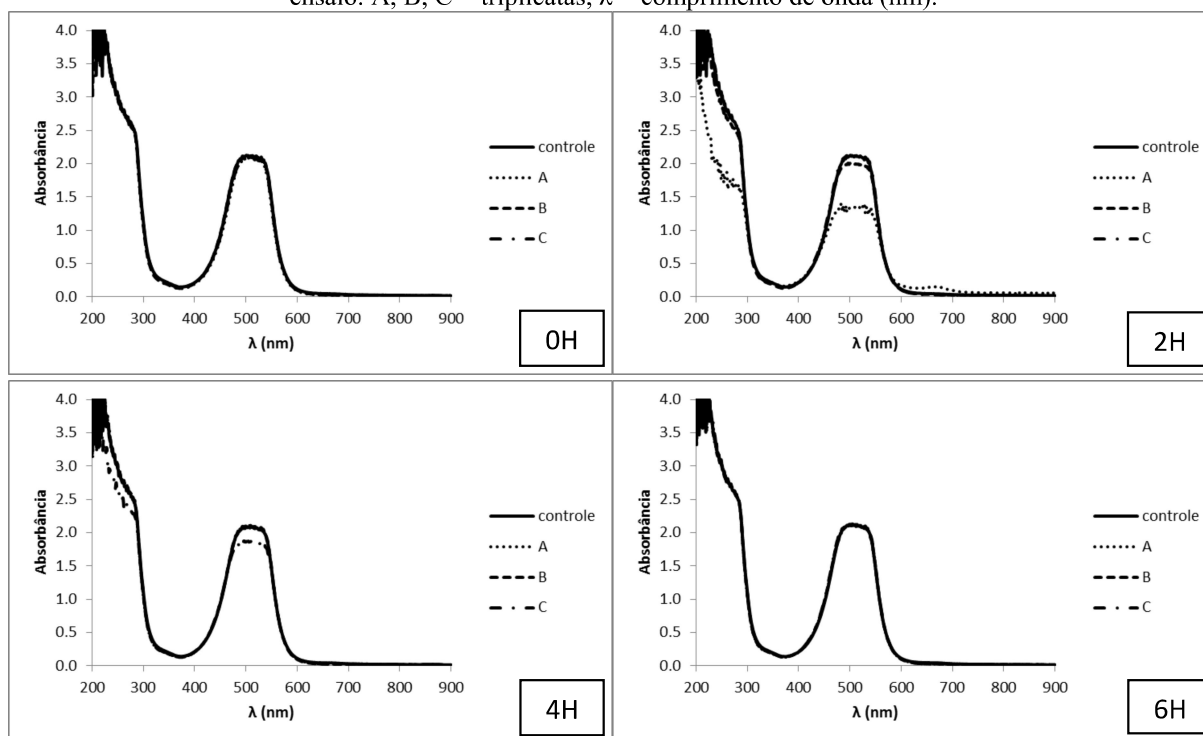
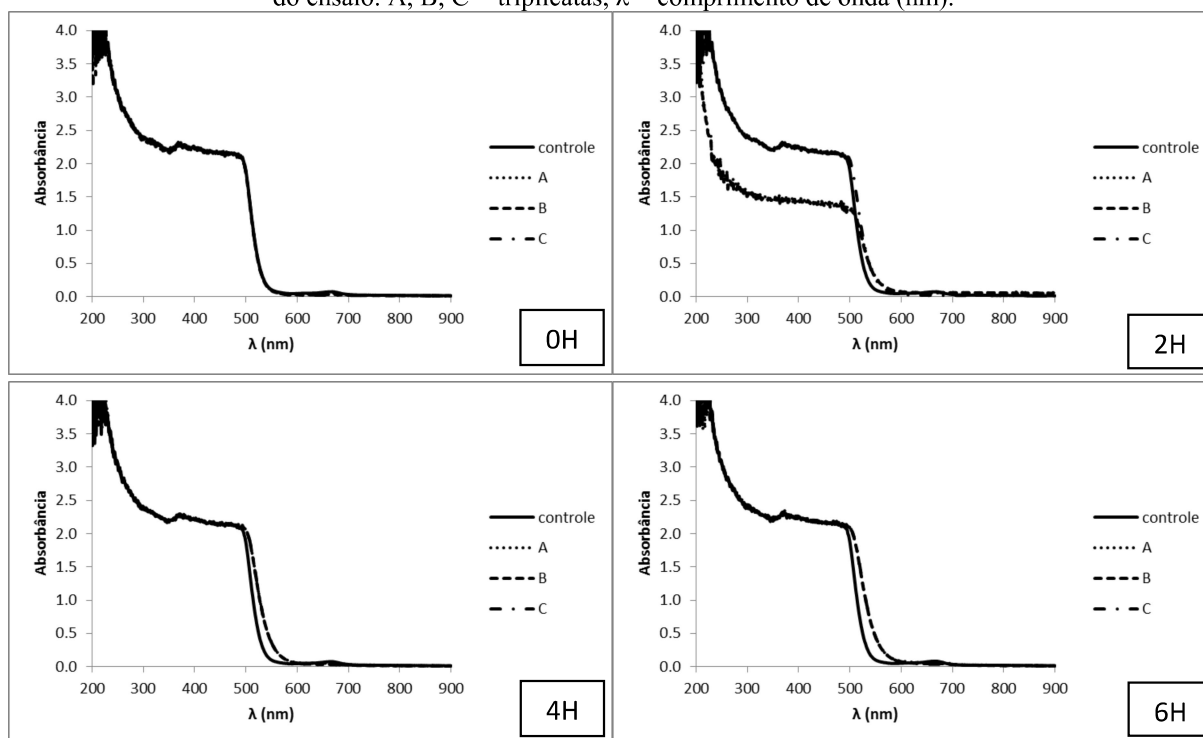


Figura 13 – Curva de degradação do corante vermelho de fenol (VF) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas após o início do ensaio. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).



Através da análise de todas as figuras é possível perceber que somente os corantes pardo de bismarck Y e preto de eriocromo T apresentaram degradação.

Nota-se na Figura 10 que a degradação do pardo de bismarck Y ocorreu dentro das 2 horas iniciais, mantendo-se estável nas horas seguintes. Diferentemente dos outros corantes azo aqui estudados (alaranjado de metila, chromotrope 2R e preto de eriocromo T), que possuem apenas um grupamento ($-N=N-$), o pardo de bismarck Y possui dois grupamentos. Isso talvez justifique a sua degradação, uma vez que a natureza dos substituintes presentes nos anéis de benzeno do corante influencia a ação da enzima, e os grupos hidroxila (OH) e amino (NH_2) aumentam a degradação (SOARES, 2000; PERALTA-ZAMORA, 2007).

O preto de eriocromo T, assim como o pardo de bismarck Y, também foi descolorido nas primeiras 2 horas de ensaio e manteve-se constante, Figura 11. Entretanto, pode-se observar que o controle também sofreu uma leve alteração após 4 horas, mesmo na ausência de lacase. Portanto, outro fator pode ter interferido na degradação do corante nas horas seguintes. Mesmo assim, pode-se dizer que a degradação do corante nas 2 horas iniciais ocorreu pela ação da lacase.

Os demais corantes estudados neste ensaio não apresentaram degradação na presença do extrato enzimático. Alguns fatores podem ter interferido na degradação.

Os corantes não são igualmente degradados por enzimas, uma vez que a degradação depende da estrutura química de cada corante, das condições de degradação, como concentração inicial de corante, e a presença ou não de mediadores. A concentração inicial do corante é um fator importante, a maioria dos estudos descritos na literatura utilizam uma faixa de concentração de corantes que varia entre 50 e 1000mg.L⁻¹ (SOARES, 2000; OTTONI, 2012). Para este estudo utilizou-se a concentração inicial de corante de 200mg.L⁻¹ e não houve adição de mediadores.

Forootanfar et al. (2012) avaliaram a degradação de corantes sintéticos (ponceau-S, azul de metileno, vermelho congo, azul de bromofenol, azul brilhante de comassie, remazol brilliant blue R (RBBR)) utilizando lacases de *Aspergillus oryzae*, *Trametes versicolor* e *Paraconiothyrium variabile*. As soluções de corantes contendo lacase (16,7 U/mL) foram incubadas em shaker, a 35°C e 120rpm, por 3 horas. A enzima de *P. variabile* foi a mais eficiente, descolorindo azul de bromofenol (100%), azul brilhante de comassie (91%), ponceau-S (56%), RBBR (47%), vermelho congo (18,5%) e azul de metileno (21,3%) após 3h de incubação na presença de 1-hidroxibenzotriazol (HBT: 5mM) como mediador da lacase. Observou-se também que a eficiência de degradação de todos os corantes aumentou com a variação na concentração de HBT de 0,1mM para 5mM. Lacase de *A. Oryzae* foi capaz de remover 53% de azul de metileno e 26% de RBBR após 30 min de incubação na ausência de HBT, mas a enzima não conseguiu descolorir eficientemente outros corantes mesmo na

presença de 5mM de HBT. No caso da lacase de *T. versicolor*, apenas o RBBR foi descolorido (93%) na ausência de HBT após 3h de incubação.

Há relatos na literatura de que corantes pertencentes à classe antraquinona são substratos enzimáticos que são diretamente oxidados por lacase, enquanto a degradação de corantes das classes azo e índigo envolve a presença de mediadores (PERALTA-ZAMORA, 2003). Segundo Claus et al. (2002), o uso de mediadores melhora a taxa de degradação e ainda amplia o espectro de atuação da enzima que passa a atuar sobre corantes inicialmente resistentes à degradação enzimática.

Ratanapongleka e Phetsom (2014) analisaram a capacidade da lacase bruta de *Lentinus polychrous* em descolorir vários corantes com diferentes estruturas químicas: azo (Reactive Preto 5, Laranja Reativo 16, Verde Reativo 19, Alaranjado de metila), indigóide (Índigo Carmim) e antraquinônico (Azul Ácido 80, Azul Água). Estes corantes foram testados a pH 5,0 e a degradação observada após 120 minutos do início dos experimentos. O azul ácido 80 e o Azul Água foram descoloridos 85% e 30%, respectivamente. O Índigo Carmim foi descolorido apenas 20%, enquanto que todos os corantes azo obtiveram menos de 10% de degradação. Esses resultados indicam que a lacase bruta descolore corantes antraquinônicos mais eficientemente do que outras classes de corantes. Entretanto, a degradação de corantes das classes azo e indigóide pode ser aumentada com a adição de mediadores.

A eficiência de degradação foi expressa em termos de porcentagem de degradação dos corantes, para isso utilizou-se a Equação 3, adaptada de Campos (2010).

$$\%descoloração = \frac{Abs_{controle} - Abs_{corante}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (3)$$

Onde Abs = absorbância e controle = corante + tampão + extrato enzimático inativado.

Os resultados obtidos da eficiência de degradação de cada um dos corantes podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Eficiência de degradação dos corantes em estudo pela ação do extrato enzimático.

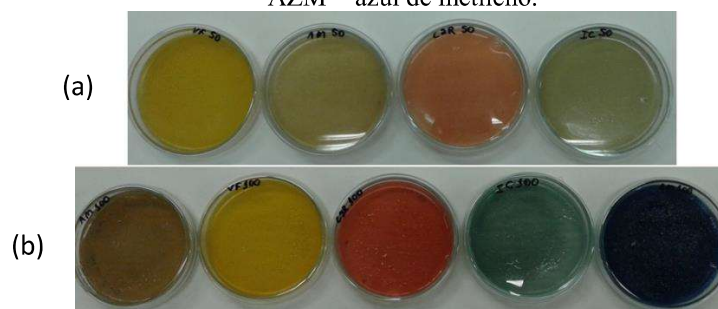
Corante	Eficiência de Degradação (%)
Alaranjado de metila	0
Azul de metileno	0
Chromotrope 2R	0
Cristal violeta	0
Índigo carmim	0
Pardo de bismarck Y	51,9
Preto de eriocromo T	67,0
Safranina T	0
Vermelho de fenol	0

O resultado do estudo de degradação com extrato enzimático não foi o esperado, uma vez que sete dos nove corantes utilizados não apresentaram degradação. Entretanto, os corantes que foram descoloridos, pardo de bismarck Y e preto de eriocromo T, obtiveram bons resultados de degradação de 51,9% e 67,0%, respectivamente. Provavelmente a concentração da enzima lacase ($46,86 \pm 0,7 \text{ UI.L}^{-1}$) foi insuficiente e/ou as condições do ensaio, como a concentração do corante (200mg.L^{-1}), não foram as melhores para a degradação dos corantes em estudo. Além disso, a ausência de mediadores pode ter interferido no ensaio de degradação, principalmente para os corantes das classes azo e índigo.

5.3 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO EM ÁGAR

Um novo experimento foi realizado para avaliar a degradação de corantes pelo *C. subvermispora*. Neste estudo de degradação o *C. subvermispora* foi inoculado em placas de Petri contendo meio e corante, Figura 14. Esse tipo de cultivo de fungos em meio sólido tem sido muito utilizado para avaliar o potencial ligninolítico e de degradação de compostos xenobióticos por basidiomicetos (MACHADO et al., 2006).

Figura 14 – Placas de Petri contendo meio sólido com corante nas concentrações de 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} , respectivamente. (a) VF = vermelho de fenol, ALM = alaranjado de metila, C2R = chromotrope 2R, IC = índigo carmim; (b) ALM = alaranjado de metila, VF = vermelho de fenol, C2R = chromotrope 2R, IC = índigo carmim, AZM = azul de metileno.



Nas figuras que se seguem é possível observar visualmente a degradação de cada um dos corantes, bem como as curvas de degradação obtidas através da leitura em espectrofotômetro após os 15 dias de cultivo.

Figura 15 – Degradação em meio sólido do corante alaranjado de metila (ALM) na concentração 50mg.L^{-1} .

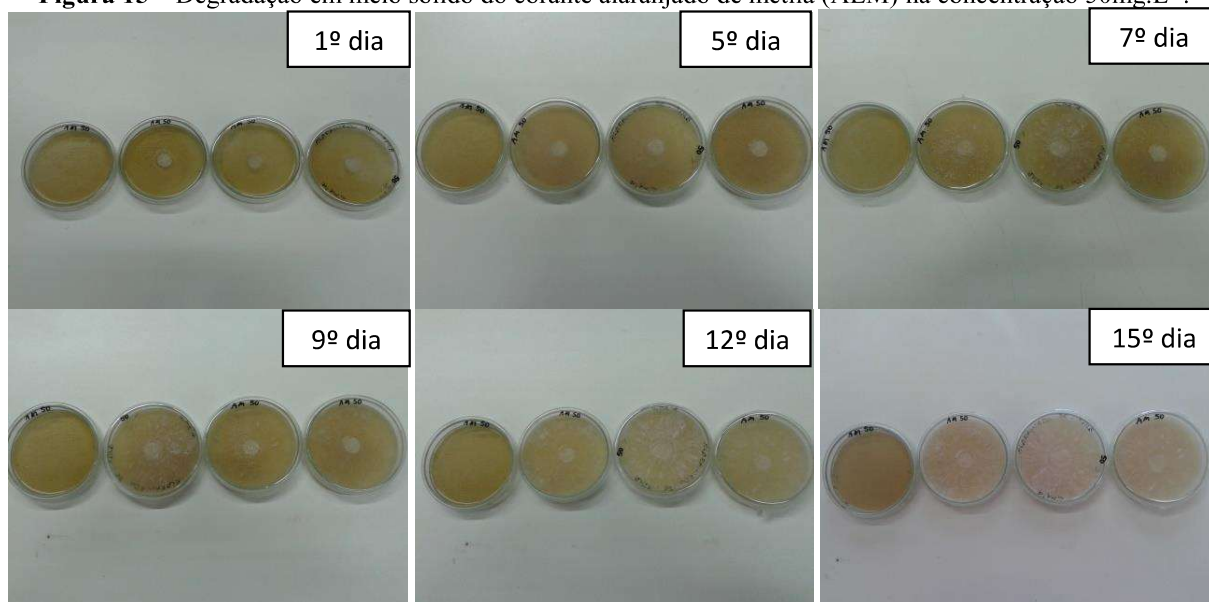
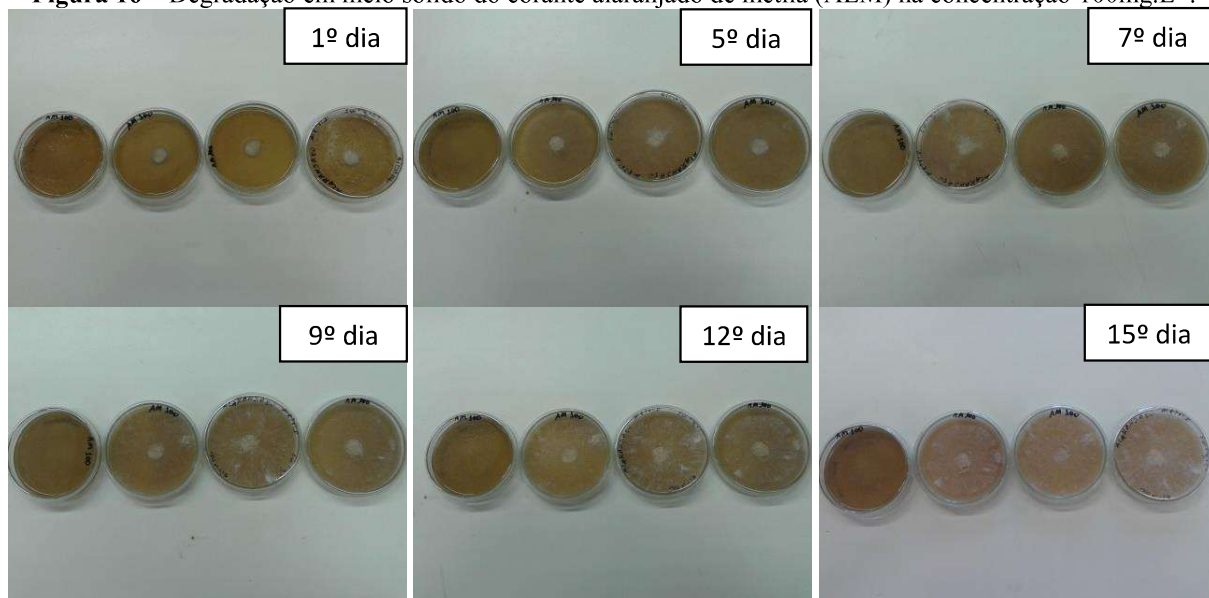


Figura 16 – Degradação em meio sólido do corante alaranjado de metila (ALM) na concentração 100mg.L^{-1} .



Analisando-se as Figuras 15 e 16 é possível ver que houve o crescimento do fungo e aparentemente a degradação do alaranjado de metila, em ambas as concentrações. Entretanto, não há diferença significativa entre as curvas de degradação apresentadas na Figura 17. Esperava-se que houvesse um pico com uma absorbância maior entre 400 e 500nm para o controle, uma vez que o ALM possui absorção nessa faixa de comprimento de onda.

Possivelmente, o método utilizado para a remoção de cor do meio ágar não foi eficiente para o corante ALM.

As curvas foram obtidas a partir de um método indireto de detecção de cor, uma vez que se tratando de um meio sólido, certamente há interferentes e erros associados, como o fato de o ágar também ter cor e o corante não ter se solubilizado totalmente no tampão.

Figura 17 – Curva de degradação do corante alaranjado de metila (ALM), após 15 dias, nas concentrações 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} . A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).

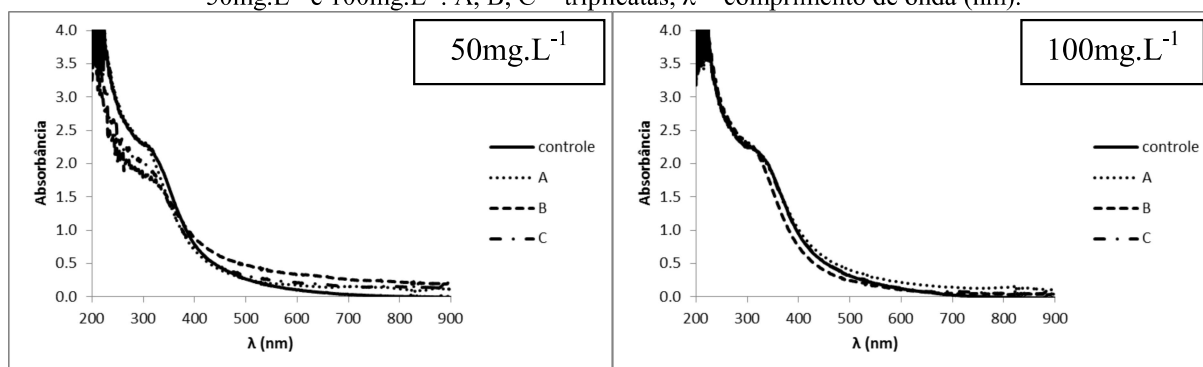


Figura 18 – Degradação em meio sólido do corante azul de metileno (AZM) na concentração 50mg.L^{-1} .

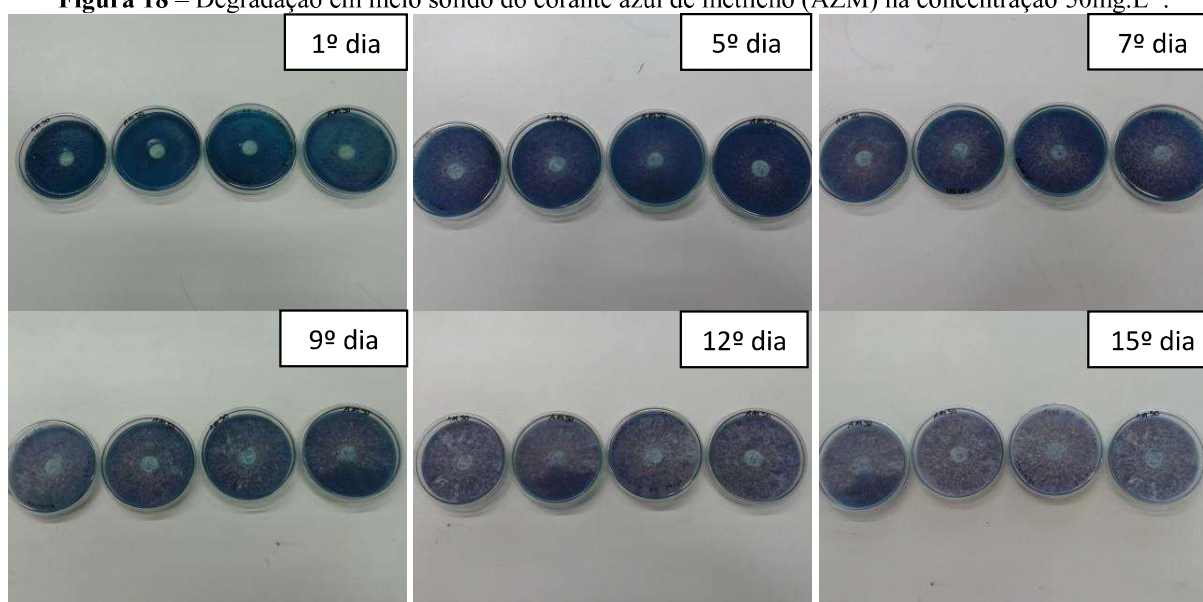


Figura 19 – Degradação em meio sólido do corante azul de metileno (AZM) na concentração 100mg.L^{-1} .

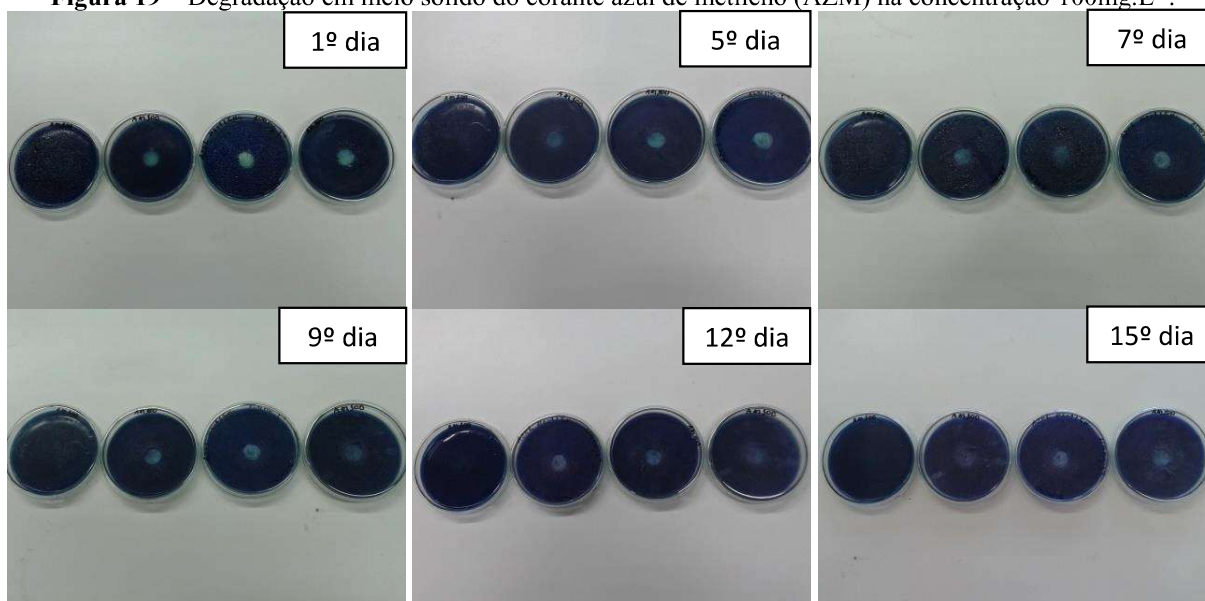
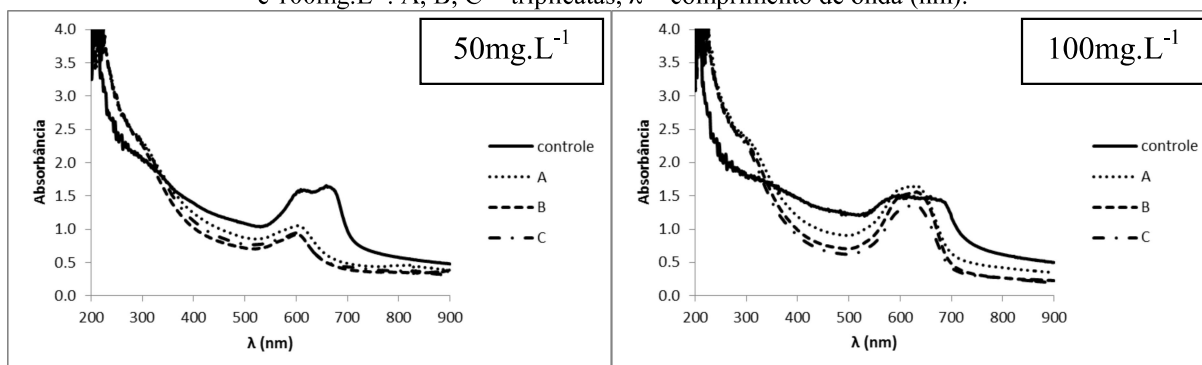


Figura 20 – Curva de degradação do corante azul de metileno (AZM), após 15 dias, nas concentrações 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} . A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).



Observando as Figuras 18 e 19, observa-se que não houve uma degradação significativa do azul de metileno na concentração de 100mg.L^{-1} . Provavelmente a concentração de 100mg.L^{-1} de corante foi tóxica, o suficiente para interferir no crescimento e desenvolvimento do *C. subvermispora*. Entretanto, é possível observar o crescimento do fungo e degradação parcial do corante na concentração de 50mg.L^{-1} .

Como não foi feita a placa controle para a concentração de 50mg.L^{-1} , a placa controle de 100mg.L^{-1} foi diluída duas vezes e utilizada como controle para a concentração 50mg.L^{-1} . De acordo com a Figura 20, observamos uma diferença entre a curva controle e as placas contendo 50mg.L^{-1} de AZM inoculadas com *C. subvermispora*. As Figuras 20 e 18 evidenciam a degradação do azul de metileno na concentração de 50mg.L^{-1} pelo *C. subvermispora*.

Figura 21 – Degradação em meio sólido do corante chromotrope 2R (C2R) na concentração 50mg.L⁻¹.

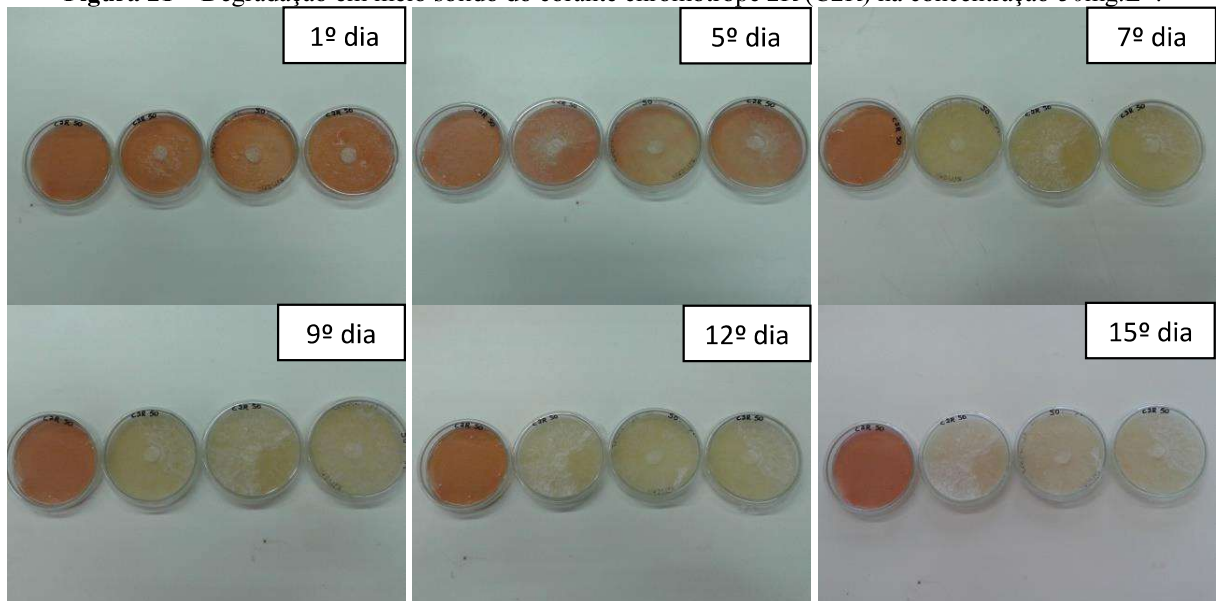


Figura 22 – Degradação em meio sólido do corante chromotrope 2R (C2R) na concentração 100mg.L⁻¹.

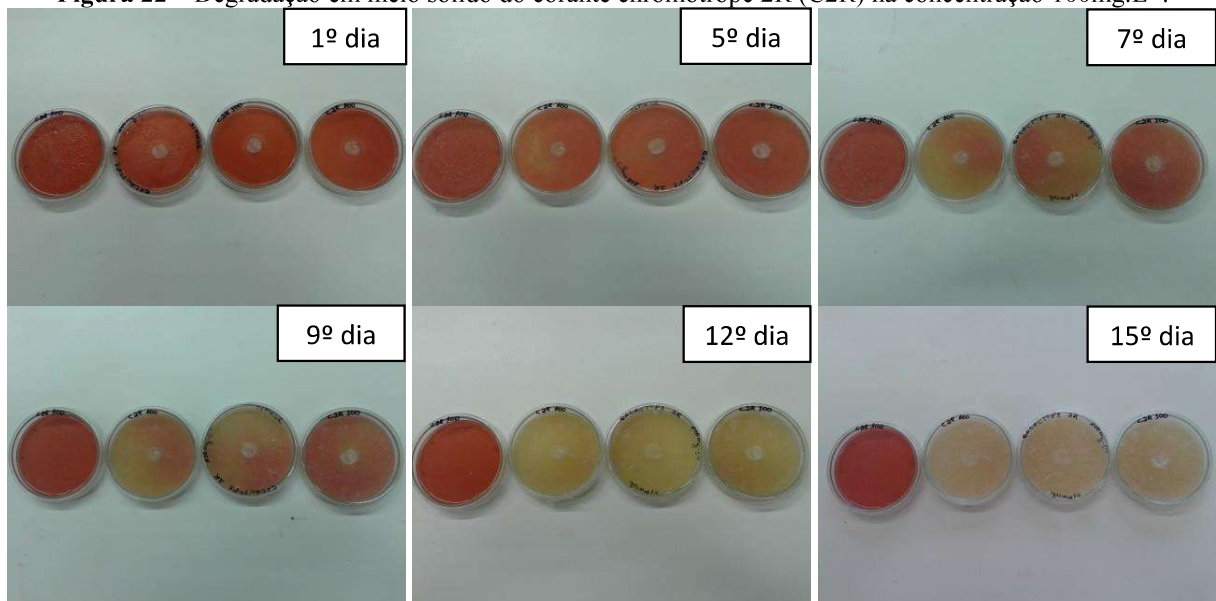
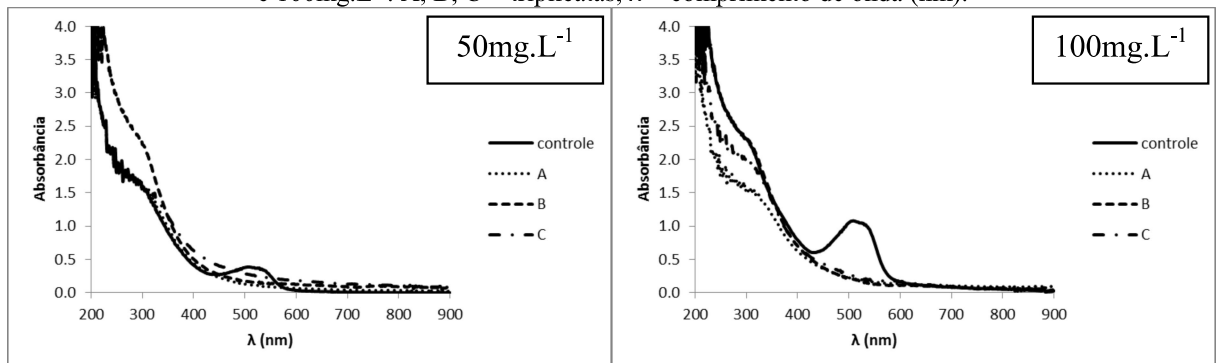


Figura 23 – Curva de degradação do corante chromotrope 2R (C2R), após 15 dias, nas concentrações 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).



Observando as Figuras 21 e 22, é possível visualizar a degradação do corante chromotrope 2R em ambas as concentrações utilizadas. Sendo que a degradação total do C2R ocorreu no 7º e 12º dias, para as concentrações de 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} , respectivamente.

Analizando-se a Figura 23 percebe-se que ambas as curvas de degradação estão de acordo com o visualizado nas Figuras 21 e 22, confirmando a capacidade do fungo e suas enzimas extracelulares em degradar o corante.

Figura 24 – Degradação em meio sólido do corante índigo carmim (IC) na concentração 50mg.L^{-1} .

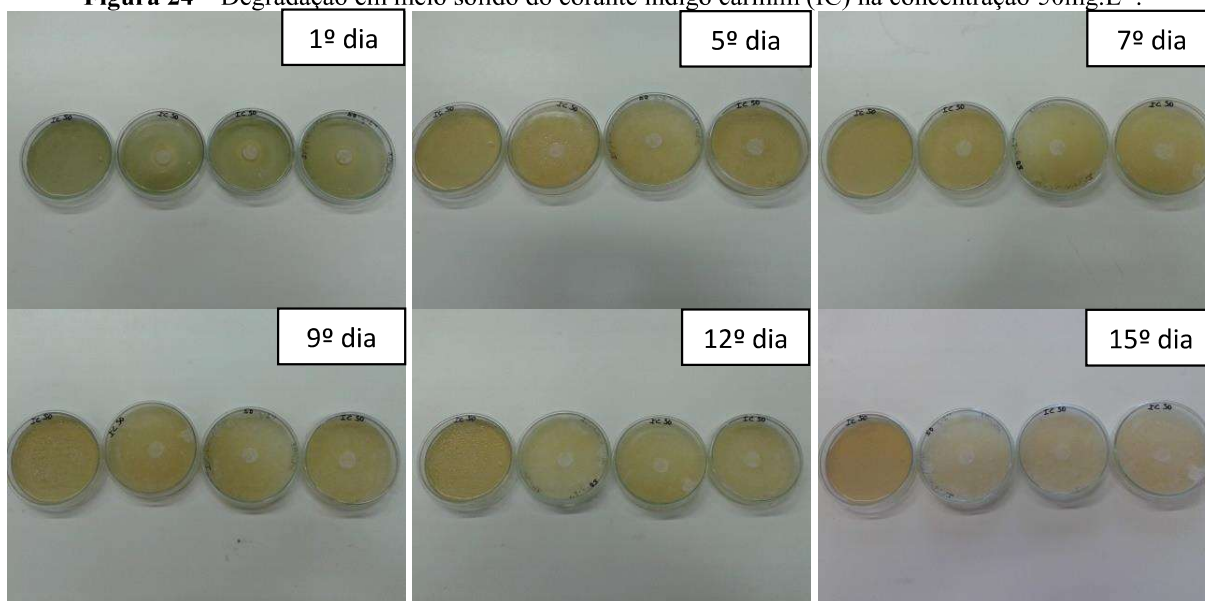


Figura 25 – Degradação em meio sólido do corante índigo carmim (IC) na concentração 100mg.L^{-1} .

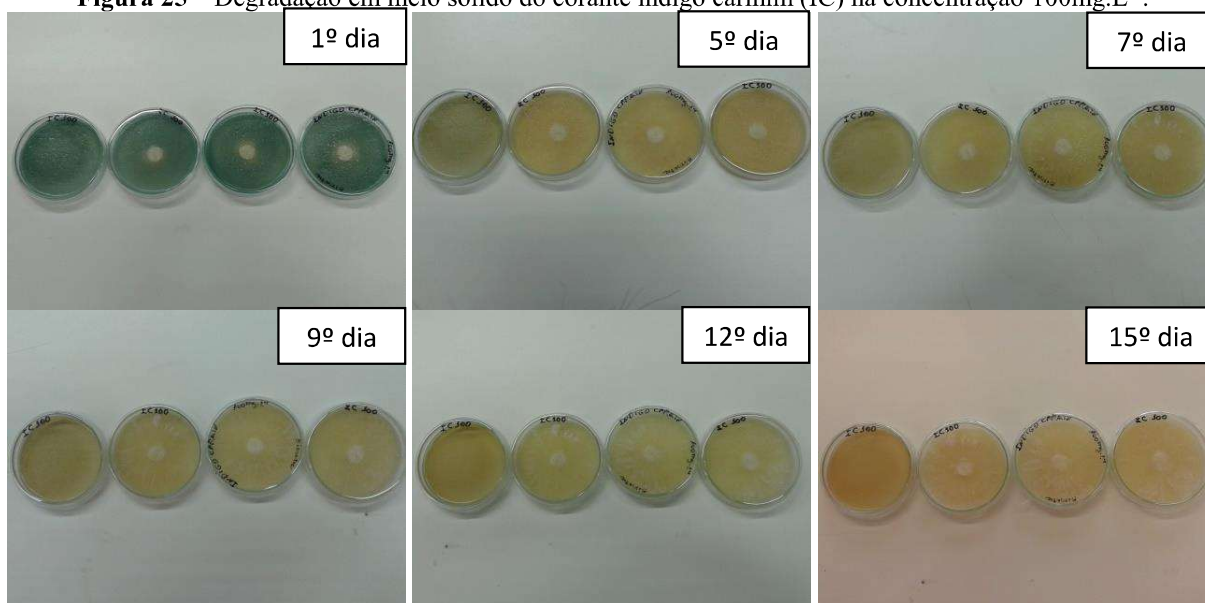
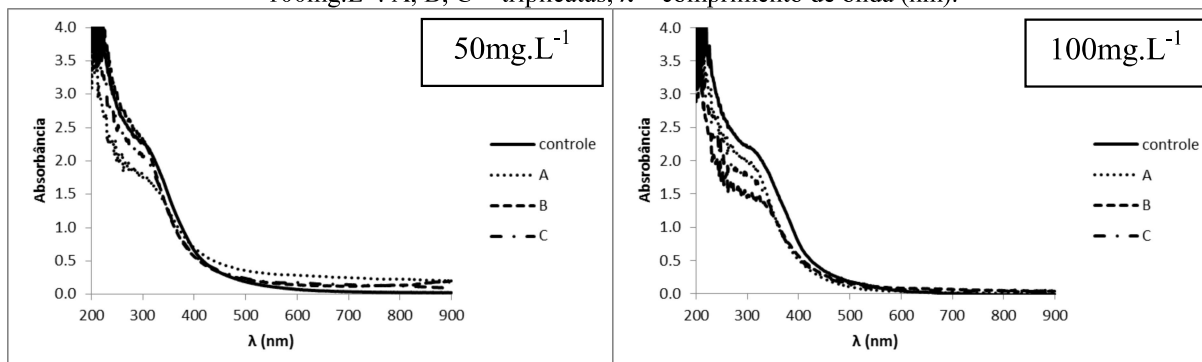


Figura 26 – Curva de degradação do corante índigo carmim (IC), após 15 dias, nas concentrações 50mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} . A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).



O corante índigo carmim na concentração de 50mg.L^{-1} , Figuras 24, e na concentração de 100mg.L^{-1} , Figura 25, foi totalmente degradado, inclusive na placa controle. Provavelmente, as condições de cultivo, a composição do meio e até mesmo a incubação favoreceram a degradação do corante. A Figura 26 apresenta a curva de degradação do IC nas concentrações de 50 e 100mg.L^{-1} , as curvas das placas controles e das placas contendo os fungos foram iguais.

Figura 27 – Degradação em meio sólido do corante vermelho de fenol (VF) na concentração 50mg.L^{-1} .

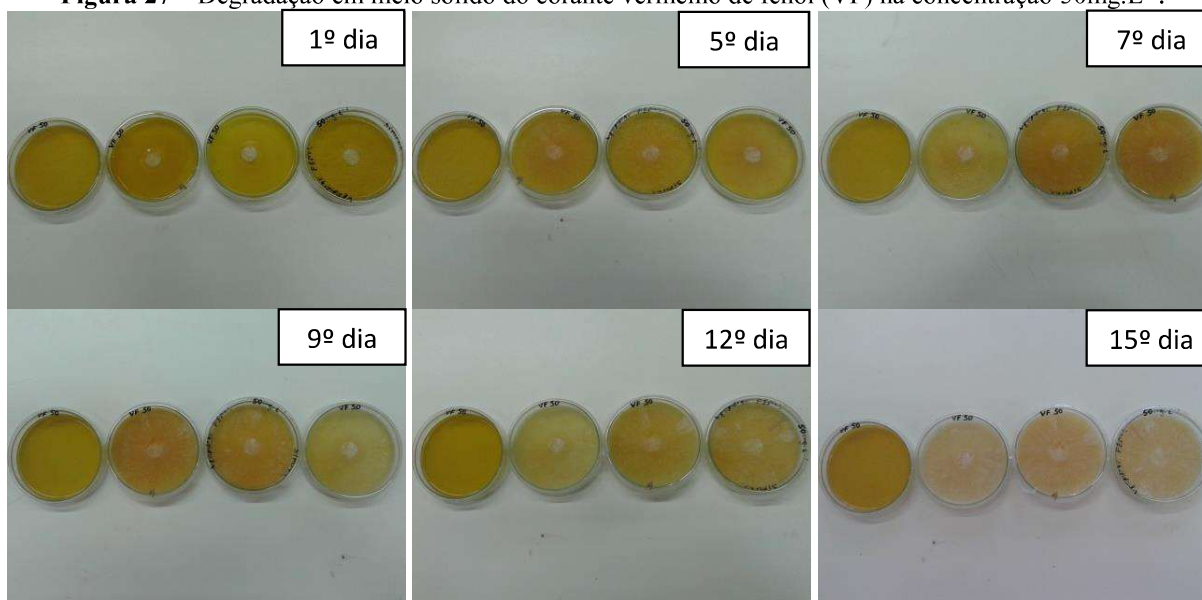


Figura 28 – Degradação em meio sólido do corante vermelho de fenol (VF) na concentração 100mg.L⁻¹.

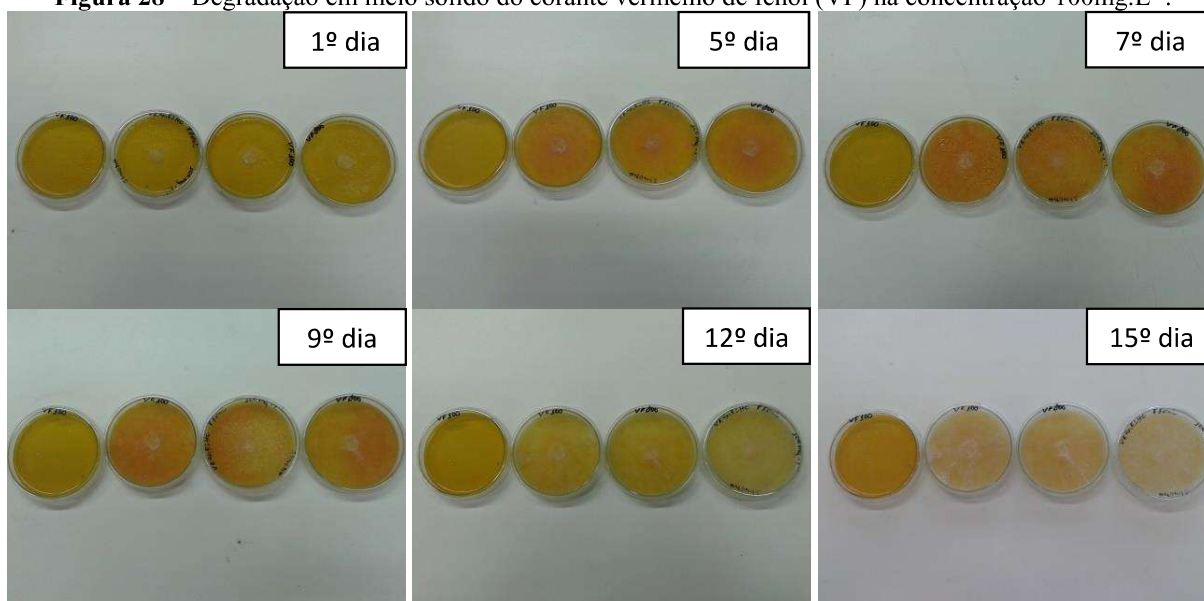
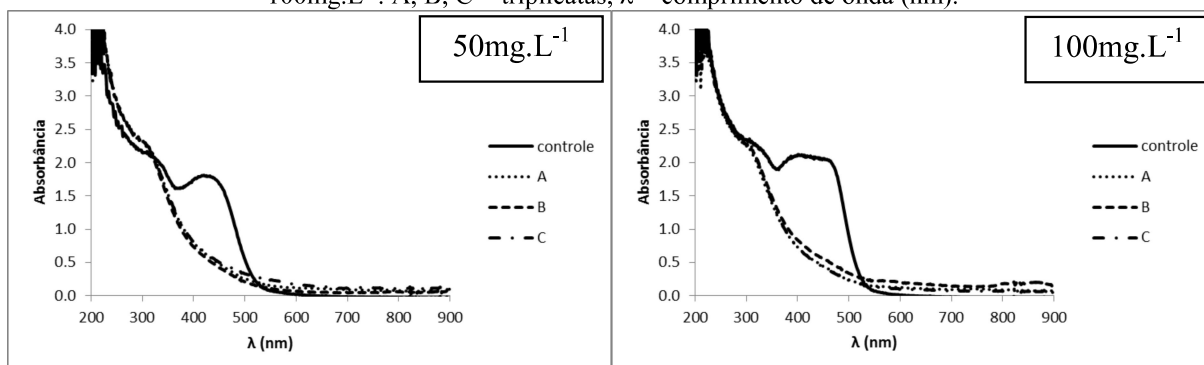


Figura 29 – Curva de degradação do corante vermelho fenol (VF), após 15 dias, nas concentrações 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹. A, B, C = triplicatas, λ = comprimento de onda (nm).



As Figuras 27 e 28 apresentam as placas contendo o corante vermelho fenol em diferentes tempos de incubação para as concentrações 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹, respectivamente. É possível notar o crescimento do *C. subvermispora* e a degradação do VF em ambos os experimentos. As curvas de degradação apresentadas na Figura 29 comprovam a degradação do vermelho de fenol em ambas as situações estudadas.

Os dados obtidos do espectro de varredura foram utilizados para calcular a porcentagem de degradação dos corantes. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5 – Eficiência de degradação dos corantes em estudo em ágar.

Corante	Eficiência de Degradação (%)	
	Ensaio com 50mg.L ⁻¹	Ensaio com 100mg.L ⁻¹
Alaranjado de metila	0	0
Azul de metileno	42,3	0
Chromotrope 2R	67,6	80,6
Índigo carmim	*	*
Vermelho de fenol	67,3	68,4

*a degradação não foi considerada, pois o controle também apresentou degradação.

O corante azul de metileno apresentou 42,3% de degradação, apenas na concentração de 50mg.L⁻¹. O chromotrope 2R foi o corante que obteve a maior degradação de 67,6% e 80,6%, para as concentrações 50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹, respectivamente. Já o vermelho de fenol, manteve uma eficiência de degradação bem próxima para ambas as concentrações, de 67,3% e 68,4%. O índigo carmim apresentou degradação, mas não foi possível calcular sua eficiência devido o controle também ter sido degradado.

O estudo de degradação em ágar obteve um bom resultado para três dos cinco corantes estudados. Os resultados obtidos comprovam a capacidade do fungo *C. subvermispora* em degradar corantes, provavelmente pela ação de suas enzimas MnP e lacase.

O contato direto do microrganismo com o corante pode ter estimulado o mesmo a produzir compostos mediadores naturais, ajudando as enzimas a degradar o corante. Outra possível hipótese pode estar ligada às condições de ensaio, como a concentração inicial de corante utilizada (50mg.L⁻¹ e 100mg.L⁻¹) ter sido, quatro e duas vezes, menor que a do estudo utilizando extrato enzimático (200mg.L⁻¹).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de efluentes contendo corantes é extremamente importante, uma vez que tais compostos podem ser tóxicos, causando grandes danos ao meio ambiente e à saúde humana. Uma alternativa promissora de tratamento é a utilização de microrganismos produtores de enzimas oxidativas.

O fungo de podridão branca *Ceriporiopsis subvermispota* mostrou-se capaz de produzir enzimas ligninolíticas. Embora a enzima MnP não tenha sido detectada, a presença de lacase foi observada, mesmo que em baixas concentrações de atividade enzimática.

O uso do extrato enzimático para o estudo da degradação dos corantes sintéticos não foi eficiente, uma vez que somente dois corantes apresentaram degradação na presença da lacase. Enquanto que o estudo de degradação em ágar mostrou-se mais eficaz na degradação, sendo que três dos cinco corantes estudados apresentaram degradação. As diferentes condições de cultivo e de ensaio utilizadas em cada um dos estudos certamente interferiram na degradação dos corantes escolhidos, garantindo uma maior eficiência ao estudo de degradação em ágar.

O desempenho de *C. subvermispota* na degradação de diferentes corantes sintéticos confirma o potencial desse fungo. O desenvolvimento de um processo baseado na degradação microbiológica e enzimática parece ser atraente devido ao potencial das enzimas ligninolíticas em degradar corantes de estruturas químicas diversas. Entretanto, para que essas enzimas sejam aplicadas na remoção de corantes de efluentes industriais, é necessário mais estudos para avaliar e encontrar as melhores condições de cultivo e, conseqüentemente, otimizar o processo de degradação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, Larissa Cardillo. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

AGUIAR, Ana Paula de. **Seleção de espécies de basidiomicetos produtoras de ligninases para caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos**. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2006.

ALFREDO, A. P. C. et al. Adsorção de azul de metileno em casca de batata utilizando sistemas em batelada e coluna de leito fixo. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, 2015. p. 1909-1920.

ALMEIDA, Janiele Mayara Ferreira de. **Aplicação da perlita expandida modificada com ortofenantrolina na remoção do negro de eriocromo T gerado em laboratórios de ensino de química**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2015.

ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO – ALESP. **Proibido o lançamento de corantes nas águas do Estado**. Disponível em: <<http://www.al.sp.gov.br/noticia/?id=336707>>. Acesso em: 23 out. 2016.

BALDRIAN, Petr. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, 2006. p. 215-242.

BALLAMINUT, Nara. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo**. 2007. 163 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 2007.

BARRETO, Norma Suely Evangelista. **Descoloração e detoxificação do azo corante alaranjado II por *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens* isolados e em cultura mista**. 2006. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

BERTOLINI, Tharcila Colachite Rodrigues. **Estudo comparativo sobre a adsorção de diferentes classes de corantes em zeólitas de cinzas de carvão: modelagem cinética e de equilíbrio**. 2014. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

BON, Elba P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, Elba P. S. et al. (Editores). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2008. p. 95-122.

CAMPOS, Edgar Silveira. **Seleção e avaliação de *Pseudomonas* para a descoloração de corantes têxteis por cultivo submerso**. 2010. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2010.

CAMPOS, Mayara Roslindo de. **Utilização da quitosana-ferro na adsorção do corante têxtil vermelho ácido 29 empregando o sistema de leito fixo**. 2013. 60 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2013.

CARDOSO, Marília Lordêlo. **Estudo da produção *in vitro* de enzimas ligninocelulolíticas por fungo basidiomiceto cultivado sob fermentação sólida de resíduos vegetais**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009.

CHAGAS, Morgane de Aguiar. **Tratamento de efluente têxtil por processos físico-químico e biológico**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2009.

CLAUS, H. et al. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, 2002. p. 672-678.

CONCEIÇÃO, Taiana de Araújo. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos Agaricomycetes cultivados em resíduos agroindustriais do estado da Bahia**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2010.

COSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução, nº 430 (13 de Maio de 2011).

CREMA, Anna Paula Safenraider. **Estudo das reações de descoloração de corantes em meio aquoso induzidas por plasma frio**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

CRUZ JÚNIOR, Américo. **Estudo da atividade enzimática de lacase imobilizada em quitosana**. 2003. 43 f. Estágio Curricular – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

CUNHA, Gina Gabriela Seabra. **Atividade peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a degradação de lignina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2008.

DAMINELLI, Pedro Eduardo. **Estação de tratamento de efluente: eficiência**. 2008. 94 f. Monografia (Especialista em Gestão de Recursos Naturais), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2008.

DOMINGOS, Marcelo. **Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação**.

2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2009.

ESCARAMBONI, Bruna. **Produção de amilases pelo cultivo em estado sólido de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose.** 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2014.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Introdução. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. (Orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 09-11.

FARIA, Robson de Almeida. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*.** 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2010.

FERRAZ, André Luiz. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. (Orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 215-242.

FOROOTANFAR, H. et al. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. **Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, v. 9, n. 27, 2012.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, 2001. p. 225 – 232.

GALHAUP, C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, 2002. p. 2159 – 2169.

GAMBA, J. R. et al. **Produção de enzimas extracelulares por *Ceriporiopsis subvermispora* durante cultivo submerso.** In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. 2009. Uberlândia.

GARCIA, Telma Alves. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*.** 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. (Orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 125-169.

GONÇALVES, Aline Zorzetto Lopes. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal.** 2010. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2010.

HIMEDIA. **Catálogo de corantes.** Disponível em: <https://issuu.com/eximlab/docs/cat_logo_de_corantes_-_himedia>. Acesso em: 25 out. 2016.

KAMMRADT, Patrícia Bastos. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada.** 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

LEAL, Cláudia Sofia Mendes. **Solubilidade de corantes azo.** 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial), Universidade da Beira Interior, Covilhã. 2011.

LEITÃO, V. S. F.; CARVALHO, M. E. A.; BON, E. P. S. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: comparison to reported methods. **Dyes and Pigments**, v. 74, 2007. p. 230-236.

MACEDO, Maria Lucila Hernández. **Identificação de transcritos de *Ceriporiopsis subvermispota* expressos nas fases iniciais da biodegradação da madeira.** 2006. 105 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

MACIEL, Carla do Couto Soares. **Produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante por *Curvularia lunata* (UFPEA885), usando óleo diesel como substrato.** 2010. 142 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

MADHAVI, V.; LELE, S.S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, 2009. p. 1694-1717.

MANCILHA, Eliana Santos de Lyra. **Seleção de basidiomycetes coletados e isolados em área de mata atlântica – PE, com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos.** 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

MAYER, Alfred M.; STAPLES, Richard C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, 2002. p. 551 – 565.

MENDES, André Aguiar. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota*.** 2008. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2008.

MOREIRA NETO, Sérgio Luiz. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica.** 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2012.

MUNEER, M. et al. Semiconductor-mediated photocatalysed degradation of two selected azo dye derivatives, amaranth and bismarck brown in aqueous suspension. **Journal of Hazardous Materials**, v. B127, 2005. p. 172-179.

NASCIMENTO, Carlos Roberto Sobrinho do. **Avaliação do potencial de descoloração e detoxificação de corantes utilizados em indústria têxtil por fungos isolados de sedimento do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011.

OLIVEIRA, José Ronaldo; SOUZA, Roberto Rodrigues de. **Biodegradação de efluentes contendo corantes utilizados na indústria têxtil**. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA FAP-SE. 2003. Aracaju.

OLIVEIRA, Marcella Cardoso Lemos de. **Descoloração de corante industrial têxtil por *Pseudomonas oleovorans* cbmai 0703**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

OLIVEIRA, S. P. et al. Avaliação da capacidade de adsorção do corante azul de metileno em soluções aquosas em caulinita natural e intercalada com acetato de potássio. **Cerâmica**, v. 59, 2013. p. 338-344.

OLLIKKA, P. et al. Decolorization of azo, triphenyl methane, Heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, 1993. p. 4010-4016.

ORTIZ-MONSALVE, Santiago. **Estudo de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10**. 2015. 171 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

OTTONI, Cristiane Angélica. **Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho. 2012.

PEIXOTO, F.; MARINHO, G.; RODRIGUES K. Corantes Têxteis: Uma Revisão. **Holos**, ano 29, v. 5, 2013. p. 98-106.

PERALTA-ZAMORA, P. et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 42, 2003. p. 131-144.

PINKOSKI, Pascual Isoldi. **Produção de lacase e descoramento do vermelho congo e verde malaquita pelo *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor***. 1997. 175 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1997.

QUADROS, Silvana Stefanel de. **Tratamento e reutilização de efluentes têxteis gerados nos tingimentos de tecidos de algodão**. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau. 2005.

RATANAPONGLEKA, Karnika; PHETSOM, Jirapa. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from *Lentinus polychrous* lev. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n.1, 2014. p. 26-30.

RIBEIRO, Juliana Martins. **Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem**. 2006. 58 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 2006.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C. et al. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, 1993. p. 1792-1797.

SAGGIORO, Enrico et al. **Fotocatálise solar na remediação de corantes indigoides usados no tingimento de fios de algodão**. In: III SEMINÁRIO DE I&DT – Centro Interdisciplinar de Investigação e Inovação, Instituto Politécnico de Porto Alegre. 2012. Porto Alegre.

SALEM, I. A. et al. Application of montmorillonite-Cu(II)ethylenediamine catalyst for the decolorization of chromotrope 2R with H₂O₂ in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 139, 2015. p. 130-137.

SANTOS, Hévila Brognaro dos. **Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispota* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol**. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

SILVA, Maria Cristina. **Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo**. 2011. 135 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João Lúcio de. (Orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 337-375.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. 2006. Curso de capacitação de monitores e educadores – Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 2006.

SOARES, Graça Maria Barbosa. **Aplicação de sistemas enzimáticos a degradação de corantes têxteis**. 2000. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho. 2000.

SORIANO, J. J. et al. Toxicity of the azo dyes acid red 97 and bismarck brown Y to western clawed frog (*Silurana tropicalis*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, 2014. p. 3582-3591.

SOUZA, R.S. et al. A Importância da Qualidade da Água e os seus Múltiplos Usos: Caso Rio Almada, Sul da Bahia. **Revista Eletrônica do Prodepa**, v. 8, n. 1, 2014. p. 26-45.

TAVARES, Ana Paula Mora. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro. 2006.

TEODORO, Filipe Simões. **Adsorção de metais e corantes em celulose modificada com anidrido trimelítico**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2015.

TISCA, Juliana Fabrício. **Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de recursos hídricos do litoral norte do Rio Grande do Sul (Brasil): descoloração de corantes**. 2011. 57 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé. 2011.

TROMBINI, R. B.; OBARA-DOI, S. M. Remoção de cor e análises físico-química de efluentes de indústrias têxteis tratados com *Ganoderma* spp. **Revista F@pciência**, Apucarana, v.9, n. 12, 2012. p. 101-122.

UREK, Raziye Ozturk; PAZARLIOGLU, Nurdan Kasikara. Enhanced production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, 2007. p. 913-920.

VILLELA, Sabrina Moro. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papelreiras**. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

ZANCHETTA, Ariane. **Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2012.