



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS  
CURSO DE ENGENHARIA BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE E SULFATO DE COBRE  
NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO FUNGO  
*Lentinus crinitus* CCIBt 2611**

**SUMÉ - PB  
2016**

**JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE E SULFATO DE COBRE  
NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO FUNGO**

*Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Tecnologia e Bioprocessos.

**Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.**

**SUMÉ - PB  
2016**

S676e Soares, Julya Karolyne Neres Costa.

Efeito da adição de sacarose e sulfato de cobre na descoloração do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus Crinitus* CCIBT 2611. / Julya Karolyne Neres Costa Soares. Sumé - PB: [s.n], 2016.

56 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Tratamento de efluentes. 2. Biorremediação. 3. Mediadores enzimáticos. 4. Fungo *Lentinus Crinitus* CCIBT 2611. I. Título.

CDU: 628.32(043.1)

**JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES**

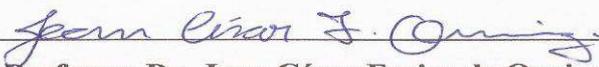
**EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE E SULFATO DE COBRE  
NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO FUNGO  
*LENTINUS CRINITUS* CCIBT 2611.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Tecnologia e Bioprocessos.

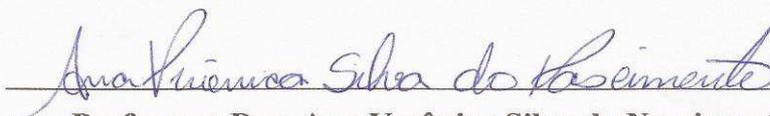
**BANCA EXAMINADORA:**



**Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.  
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG**



**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.  
Examinador I - UAEB/CDSA/UFCG**



**Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.  
Examinador II - UAEB/CDSA/UFCG**

**Trabalho aprovado em: 02 de junho de 2016.**

**SUMÉ - PB**

*Aos meus pais, Maria José e Jucier Leite,  
meu irmão Manoel Cardoso e meu avô  
Joaquim Inácio, pelo apoio, carinho e  
amor. A minha avó Inácia, in memoriam.*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca desistir de mim. Por me amparar nos momentos mais difíceis, por atender a todos os meus pedidos, por cuidar de mim e da minha família. Pela sabedoria a mim concedida para finalizar esse trabalho e pelas vitórias alcançadas em minha vida.

A minha mãe Maria José Neres, por ser um anjo em minha vida. Por sempre acreditar em mim. Pelo cuidado, dedicação, incentivo, confiança, apoio, amor e carinho. Por rezar pela minha vida e segurança, longe de casa. Por existir e ser uma pessoa tão iluminada na minha vida. Você é um exemplo de mulher e mãe. Espero um dia ser a metade da pessoa maravilhosa que és. Eu te amo demais!

Ao meu pai Joucier Leite e irmão Manoel Cardoso, pelo apoio, carinho e amor. Por sempre acreditarem no meu potencial. Pelos conselhos, motivação. Amo vocês!

Ao meu avô Joaquim Inácio, pelo amor, pelo apoio desde o início, tanto em orações como financeiramente. Por acreditar em mim. És um grande homem, o pilar da nossa família, um exemplo de avô, pai, bisavô, homem, esposo. Espero ser metade da pessoa iluminada que és. Eu te amo muito!

A minha avó Inácia Neres, in memoriam, por me apoiar em tudo, por toda minha vida até o fim da sua. Queria muito que estivesses presente para a minha vitória ser a sua também. Sei que estás no céu olhando por mim. Te amo pra sempre!

As minhas tias Fátima Neres e Lourdes Neres, minha prima Kaline Priscila, meus primos Jonas, Júnior, Netão e Reinaldo. Pelo carinho, amor e apoio. Por acreditarem em mim. A minha vida não seria a mesma coisa sem vocês. Amo vocês e as nossas bagunças!

As minhas sobrinhas Alice Neres e Letícia Neres, por serem tão lindas e amadas pela família inteira. Vocês são meus tesourinhos. Titia ama vocês demais.

Aos meus avós Maria e Antônio, minhas tias Cida, Dinha, Terezinha, minha prima Isabela e toda a minha família por parte de pai. Pelo amor e carinho.

A professora orientadora Dr<sup>a</sup>. Glauciane Danusa, pelos ensinamentos diários, por aguentar os meus apanhos. Por me apoiar e me aceitar como sua orientanda. Obrigada!

Aos professores Jean, Mérgia, Franklin, Ranoel, Michele, Aldre, Ilza, pelos conhecimentos a mim, concedidos. Obrigada!

As minhas lindas Thais, Sophia, Julia e Luana. Pela amizade, apoio, incentivo, companheirismo por estarem sempre do meu lado nos momentos felizes e tristes. Pelas

conversas, brincadeiras, bagunças. Minha vida ficou mais feliz depois de vocês. Quero levar essa amizade sincera pro resto da minha vida. Amo vocês!

As perigosas Estela, Náh, Milca, Gil e Hellany. Por me darem a alegria de conviver com vocês esses anos de Universidade. Foi perfeito e lindo porque vocês estavam do meu lado. Levarei vocês pra sempre em minha vida. Obrigada pela amizade, carinho, confiança, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

A Anthares Dias, pela amizade, carinho, pelos aperreios diários. Por estar do meu lado nos momentos difíceis e de realizações. Por fazer o possível pra me ajudar quando precisei, sempre cuidando de mim. Por acreditar no meu potencial, e me motivar. Por me emprestar um lugarzinho na sua casa, nos fins de semana da pós graduação. Saiba que sou grata por tudo. Te amo!

A Estela Beatriz, Tamara Aline, Hemerson Viana, Carlinha Araújo, Leandro Costa, Felipe Douglas, Vinicius Costa, Ademir Sendy, pela amizade. Vocês foram especiais nesses anos de Universidade. Compartilhamos alegrias, farras, preocupações, aperreios de provas, trabalhos e tudo mais. Obrigada pela amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Veterinário, professor Dr. Felício Garino, Ednaldo, Rodrigo, pelos conhecimentos a mim, concedidos. Aos meus companheiros, Aline, Larry, Neide e Jailson, que me receberam tão bem durante o período do estágio. Sou muito grata a vocês.

A professora Nara Ballaminut, pelas contribuições concedidas a este trabalho.

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho da vida, que o mais importante é decidir.”*

*Cora*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Diagrama 1</b> - Diagrama de Pareto para variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta atividade enzimática .....	41
<b>Diagrama 2</b> - Diagrama de Pareto para variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta descoloração.....	44
<b>Diagrama 3</b> - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta crescimento fúngico .....	46
<b>Gráfico 1</b> - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante na concentração de 20 mg.L <sup>-1</sup> , com 0 % de sacarose e 0mM de Sulfato de cobre.....	36
<b>Gráfico 2</b> - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante concentração de 20 mg.L <sup>-1</sup> com 5 % de sacarose e 0mM de Sulfato de cobre .....	37
<b>Gráfico - 3</b> Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante vermelho congo na concentração de 20 mg.L <sup>-1</sup> com 0 % de sacarose e 2mM de Sulfato de cobre .....	38
<b>Gráfico 4</b> - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante com 5 % de sacarose e 2mM de Sulfato de cobre .....	39
<b>Gráfico 5</b> - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante com 2,5 % de sacarose e 1mM de Sulfato de cobre, representando a média dos pontos centrais.....	40
<b>Gráfico 6</b> - Representação da porcentagem de descoloração do Vermelho Congo.....	43
<b>Gráfico 7</b> - Representação da biomassa fúngica nos diferentes ensaios .....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do corante Vermelho Congo, contendo um grupo diazo como grupo cromóforo. ....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do corante Marrom Bismark .....	18
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do corante Amarelo Metanil. ....	19
<b>Figura 4:</b> Estrutura Química do corante Índigo Azul. ....	19
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do corante Cibacete Brilliant Blue. ....	20
<b>Figura 6:</b> Estrutura molecular típica de corantes pré-metalizados. ....	20
<b>Figura 7:</b> Estrutura molecular típica de corante reativo. ....	21
<b>Figura 8:</b> Fungo <i>Lentinus crinitus</i> CCIBt 2611 cultivado em meio MEA (2%) repicado em placa de Petri com aproximadamente 7 dias. ....	30
<b>Figura 9:</b> Corante Vermelho Congo na concentração de 2,5 g/L.....	31
<b>Figura 10:</b> (A) Cortes correspondentes a 1/8 da placa; (B) Micro-organismos inoculados no meio de cultura contendo o corante. ....	32
<b>Figura 11:</b> (A) Cultivo em incubadora; (B) Cultivo após 48 horas na incubadora. ....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Tipos de tecnologias de biorremediação (Ballaminut, 2007). .....	25
<b>Tabela 2</b> - Concentrações da mistura de reação para determinação da atividade enzimática. 34	
<b>Tabela 3</b> - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial .....	35
<b>Tabela 4</b> - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ com três repetições no ponto central .....	35
<b>Tabela 5</b> - Atividade enzimática dos ensaios do planejamento .....	41
<b>Tabela 6</b> - Porcentagem de descoloração do corante em cada ensaio, em cultivo de 96 horas .....	43
<b>Tabela 7</b> - Biomassa fúngica nos diferentes ensaios.....	46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\lambda$	Absorbância máxima
ABST	ácido 2,2' -azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico
CCIBt	Coleção de Cultura de Basideomicetos do Instituto de Botânica
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
$\text{CuSO}_3$	Sulfato de Cobre
g/L	Gramas por Litro
LD50	Dose Letal de 50%
LiP	Lignina Peroxidase
MEA	Ágar Extrato de Malte
mL	miliLitro
mM	miliMolar
MnP	Manganês Peroxidase
PC	Pontos Centrais
PB	Paraíba
pH	Potencial Hidrogeniônico
POA	Processos Oxidativos Avançados
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
U/mL	Unidade por mililitro
VC	Vermelho Congo

## RESUMO

Avalia o efeito da adição de sacarose e de Sulfato de Cobre na descoloração do corante Vermelho Congo pelo fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611. Para tanto, avalia a descoloração do corante na concentração de 20mg/L em diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre em meio líquido estacionário. As máximas porcentagens de descoloração são de 84,7%, em 96 horas de incubação para uma concentração de 2,5% de sacarose e 1mM de sulfato de cobre. O micro-organismo conseguiu manter o crescimento na concentração de corante em que foi submetido e tolerou a exposição demorada nas diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre, mantendo um aumento de biomassa, atingindo o valor máximo de 2,31g/L na concentração de 5% de sacarose. O valor de pH variou entre 5 e 6,5, indicando valores ideais para o crescimento do fungo e a descoloração. O estudo da atividade enzimática detecta que o micro-organismo é capaz de produzir a enzima lacase, alcançando o valor de 87,46U/mL na concentração de 5% de sacarose. A partir do exposto pode-se dizer que o fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 se configura, um micro-organismo com grande potencial de degradação de corantes azóicos, como o Vermelho Congo, permitindo o emprego de um método promissor para tratamento de efluentes na descoloração do corante.

**Palavras-chaves:** Vermelho Congo. Biorremediação. Tratamento de efluentes. Fungo. Mediadores enzimáticos.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the addition of sucrose and Copper Sulfate in decolorization of the dye Congo red by the fungus *Lentinus crinitus* CCIBt 2611. Dye decolorization was evaluated in the concentration of 20mg / L in different sucrose and copper sulfate concentrations in stationary liquid medium. The maximum discoloration rates were 84.7% in 96 hours of incubation at a concentration of 2.5% sucrose and copper sulfate (1mM). The micro-organism could keep its growth in the subjected dye concentration and tolerated its protracted exposure to different sucrose and copper sulfate concentrations, maintaining a biomass increase, reaching a maximum value of 2,31g / L in the concentration of 5% of sucrose. The pH ranged between 5 and 6.5, indicating optimal values for the fungus' growth and discoloration. The enzyme activity showed that the microorganism was capable of producing the laccase enzyme, reaching the value of 87,46U / ml at a concentration of 5% sucrose. Based on all exposed above, *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 has a high potential for azo dyes degradation, such as Congo Red, allowing the use of promising method for treating wastewater in the decolorization.

**Keywords:** Congo red. Bioremediation. Wastewater treatment. Fungus. Enzymatic mediators.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1 INDÚSTRIAS TÊXTEIS .....	16
3.2 CORANTES TÊXTEIS .....	17
<b>3.2.1 Classificação dos corantes .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.2 Aspectos ecológicos e toxicológicos .....</b>	<b>21</b>
3.3 CORANTE VERMELHO CONGO .....	22
3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES .....	22
<b>3.4.1 Métodos químicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.2 Métodos físicos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4.3 Métodos biológicos ou biorremediação.....</b>	<b>24</b>
3.5 FUNGOS BASIDEOMICETOS E ENZIMAS LIGNOLÍTICAS .....	26
3.6 DEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR BASIDEOMICETOS .....	27
3.7 UTILIZAÇÃO DE SACAROSE NOS PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO .....	28
3.8 MEDIADORES ENZIMÁTICOS .....	28
3.9 INDUTORES ENZIMÁTICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>30</b>
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES .....	30
4.2 MICRO-ORGANISMO .....	30
4.3 CORANTE .....	31
4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	31

<b>4.4.1 Meio líquido para avaliação da descoloração.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4.2 Obtenção de filtrado.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.3 Descoloração do meio e aferição do pH.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.4 Atividade enzimática.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.5 Crescimento fúngico em meio líquido.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SULFATO DE COBRE NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 CRESCIMENTO FÚNGICO.....</b>	<b>44</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>7 EXPECTATIVAS FUTURAS.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As atividades industriais têxteis, nas últimas décadas, cresceram de maneira demasiada, gerando grandes problemas em virtude da eliminação de rejeitos tóxicos, oriundos de subprodutos gerados. Esses rejeitos (sólidos, líquidos e gasosos) são oriundos de operações de limpeza, tingimento e acabamento do produto, sendo responsáveis pela geração de grande quantidade de efluentes que vêm sendo produzidos em grande escala, com imensa diversidade de poluentes e concentrações. Possuem uma enorme variedade de produtos químicos, que podem causar uma série de problemas quando são descartados de forma inadequada, gerando alterações no ar, solo e água (FORGIARINI, 2006).

De acordo com Dellamatrice (2005), além da preocupação com os recursos naturais, as atenções tem sido voltadas para os efeitos que essas substâncias liberadas no ambiente podem causar a saúde humana. Estes resíduos se bioacumulam nos organismos vivos vindo a atingir a cadeia alimentar. Muitas dessas substâncias possuem potencial cancerígeno e mutagênico e os efeitos de sua entrada constante nos organismos ainda não são completamente conhecidos.

Várias alternativas têm sido desenvolvidas para o tratamento de resíduos de diferentes características, os quais englobam tratamentos físico-químicos ou biológicos, sendo este último o mais utilizado. Dentre os processos biológicos, vários organismos podem ser utilizados na degradação de corantes como: bactérias, plantas e fungos (BRUSCATO, 2011). Devido à complexidade dos resíduos, muitas vezes a degradação tem sido obtida com a combinação de mais de um tratamento. Assim, alguns tratamentos são capazes de remover a cor, porém não degradam completamente a molécula, necessitando um tratamento posterior para completar a degradação dos metabólitos formados (DELLAMATRICE, 2005).

A importância dos corantes se dá de maneira evidente, pelo fato de 10.000 diferentes corantes e pigmentos serem usados industrialmente, representando um consumo anual de cerca de 700.000 toneladas no mundo, onde somente no Brasil são 26.500 toneladas (KUNZ et al., 2002). Estima-se que atualmente 2.000 tipos de corantes estão disponíveis para a indústria. Essa diversidade se explica, uma vez que cada tipo de fibra requer corantes com características próprias e bem definidas (GUARANI E ZANONI, 2000).

O Vermelho Congo (VC) é um corante solúvel em água e capaz de tingir fibras de celulose (algodão e viscose) por meio de interações de van der Waals (BRUSCATO, 2011). De acordo com Sivakumar et al. (2014), este é largamente utilizado na indústria, possui alta toxicidade, é mutagênico e carcinogênico, além de possuir estrutura molecular complexa e

estável apresenta uma grande persistência no meio ambiente, se mantendo inalterado durante um longo período de tempo, o que aumenta ainda mais seu poder poluente.

Dentre os processos de tratamento de efluentes, a biodegradação vem sendo investigada pelas possibilidades de evitar a contaminação do ambiente. Quando este já está contaminado, a busca é por estratégias de biorremediação, que consiste na aplicação de processos biológicos no tratamento de resíduos para recuperar e regenerar os ambientes poluídos, utilizando-se de micro-organismos selecionados.

Neste sentido, a avaliação da degradação do corante Vermelho Congo a partir de fungos basidiomicetos se faz importante, em uma perspectiva de obter novos organismos capazes de atuarem de maneira mais eficaz nos processos relacionados ao tratamento de efluentes têxteis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da adição de sacarose e de sulfato de cobre na descoloração do corante Vermelho Congo pelo fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da concentração de sacarose e da concentração de sulfato de cobre, bem como da interação desses fatores sobre a degradação do referido corante;
- Avaliar o efeito das variáveis supracitadas no crescimento microbiano e na produção de lacase;
- Relacionar a degradação do corante Vermelho Congo à produção de ligninases e/ou ao crescimento do fungo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 INDÚSTRIAS TÊXTEIS

O departamento têxtil tem um papel importante na maioria dos países, resultando em um dos segmentos industriais de maior tradição sendo o carro chefe nos países emergentes. Dentre todos os outros segmentos, ele é responsável por grande parte da economia dos países desenvolvidos (FORGIARINI, 2006). No território nacional há cerca de 5.000 indústrias têxteis, sendo 11% indústrias de grande porte, 21% pequeno porte e 68% microempresas (GONDIM et al., 2007), distribuídas pela região sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará) (GUARATINI; ZANONI, 2000). São empregados quase 1,6 milhões de pessoas e o setor sozinho é responsável por cerca de 5% do PIB nacional, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT, 2015).

A utilização de grandes quantidades de água associado ao reduzido aproveitamento de insumos (corantes, detergentes, engomantes, amaciantes e outros) faz com que a indústria têxtil seja responsável por eliminar grandes volumes de resíduos, com elevada carga orgânica e forte coloração (SOUZA E ZALMORA, 2005). Entre os produtos químicos utilizados durante o processamento dentro da indústria têxtil se destacam os corantes, compostos aromáticos que possuem sua base de estrutura no benzeno (KAUSHIK E MALIK, 2008) sendo recalcitrantes, tóxicos, xenobióticos, e os efeitos do constante contato com tais compostos não são completamente conhecidos (QUEIROZ e STEFANELLI, 2011). O algodão, que é a fibra mais usada no mundo, é também o substrato que requer uma grande utilização de água em seu processamento. O tingimento de um quilograma de algodão com corantes reativos demanda de 70 a 150 litros de água, aproximadamente 600 gramas de cloreto de sódio e de 30 a 60 gramas de corante (ALLEGRE et al., 2006).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), três etapas são consideradas importantes durante o tingimento: a montagem, a fixação e o tratamento final.

**Montagem:** é a etapa onde a fibra entra em contato com a solução de corante (banho de tingimento) ou é impregnado com corantes por meio de forças mecânicas (impressão, estampa).

**Fixação:** nesta etapa o objetivo é a reação entre o corante e o tecido.

**Tratamento final:** consiste em lavagem em água corrente que retira o excesso de corante original ou não fixado à fibra têxtil, sendo a quantidade de corante perdido dependendo da classe ao qual ele pertence (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; GUARATINI; ZANONI, 1999).

A cor é o primeiro sintoma de contaminação visível no efluente, e, embora sua remoção seja uma prioridade, raramente ocorre a completa exaustão dos corantes, o que resulta na descarga do excedente em águas residuárias (SOARES, 2000).

### 3.2 CORANTES TÊXTEIS

Os corantes sintéticos são extensivamente utilizados na indústria têxtil, gráfica, dentre outras. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, o que representa um consumo anual de cerca de 700.000 toneladas no mundo e 26.500 toneladas somente no Brasil (GUARATINI E ZANONI, 2000).

Os corantes têxteis são compostos orgânicos com finalidade de conferir a uma fibra uma determinada cor. A mesma tem que estar em uma condição preestabelecida, reagindo ou não com o material durante o tingimento. Os corantes são solúveis, não abrasivos e mostram alta capacidade de absorção luminosa. A molécula de corante pode ser dividida em duas partes, um grupo cromóforo (nitro, nitroso, azo e carbonila), que proporciona a cor, e uma estrutura responsável pela fixação do corante a fibra de tecido, que é chamada de grupo auxocromo (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metoxi) (KUNZ et al. 2002). Segundo Zanoni e Carneiro (2001), os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver até 500 reações.

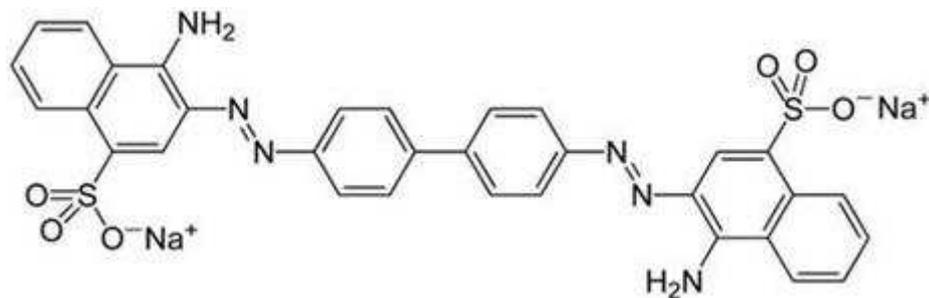
#### 3.2.1 Classificação dos corantes

Atualmente existem várias classes de corantes divididos segundo a sua fixação, como por exemplo, ácido, direto, básico, de enxofre e reativos. Sendo os corantes reativos os mais utilizados, e são assim chamados devido a sua capacidade de formar ligações covalentes com a fibra.

Segundo Guaratini e Zanoni (1999) os principais grupos de corantes classificados pelo modo de aplicação são:

**Corantes diretos:** solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose (algodão e viscose) por meio de interações de Van der Waals. É constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo ou pré-transformada em complexos metálicos. Exemplo é o corante Vermelho Congo mostrado na Figura 1.

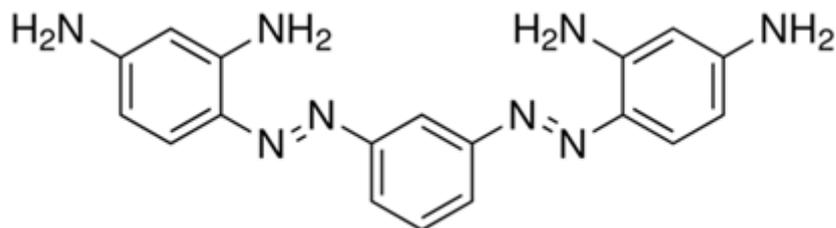
**Figura 1** - Estrutura química do corante Vermelho Congo, contendo um grupo diazo como grupo cromóforo.



**Fonte:** <http://www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps-2014-volume-2-issue-2/>

**Corantes azoicos:** insolúveis em água, que apresentam ligações azo (ligação  $-N=N-$ ) ligadas a sistemas aromáticos. A fibra é impregnada com um composto solúvel em água, chamado de agente de acoplamento. Um exemplo é o corante Marrom Bismark.

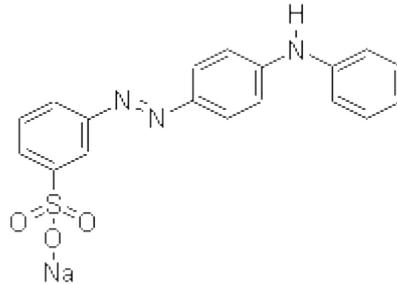
**Figura 2** - Estrutura química do corante Marrom Bismark



**Fonte:** <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02150473&country=30>

**Corantes ácidos:** ligam-se à fibra por meio de troca iônica envolvendo um par de elétrons livre dos grupos amino e carboxilatos das fibras proteicas, na forma não protonada. Caracterizado por estruturas químicas baseadas em grupos azo, antraquinona, triarilmetano, entre outros. Um exemplo é o corante Amarelo Metanil.

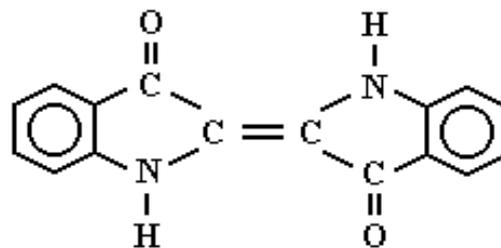
**Figura 3** - Estrutura química do corante Amarelo Metanil.



**Fonte:** <http://images.chemnet.com/suppliers/chembase/605/6059.gif>

**Corantes à cuba:** praticamente insolúveis em água, entretanto durante o processo de tintura são reduzidos, tornando-se solúveis e posteriormente oxidados, regenerando a forma original do corante a fibra. Um exemplo é o corante Índigo Azul.

**Figura 4** - Estrutura Química do corante Índigo Azul



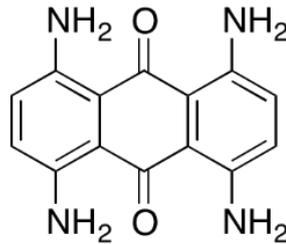
**Fonte:** <http://universechemistry.blogspot.com.br/2015/08/revise-ligacao-sigma-e-ligacao-pi.html>

**Corantes de enxofre:** compostos macromoleculares com pontes dissulfeto, altamente insolúveis em água. Um exemplo é o corante Amarelo Claro *Brysulf*.

**Corantes dispersos:** são insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose, por meio de suspensão. Usualmente o processo de tingimento ocorre na presença de agentes dispersantes

que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre corantes e a fibra hidrofóbica. Um exemplo é o corante Cibacete Brilliant Blue.

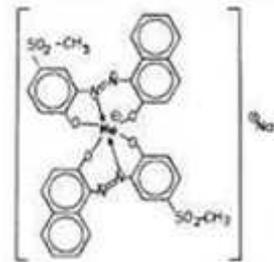
**Figura 5** - Estrutura química do corante Cibacete Brilliant Blue.



**Fonte:** <http://www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=D493475>

**Corantes pré-metalizados:** caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao grupo azo, permitindo a formação de complexo com íons metálicos.

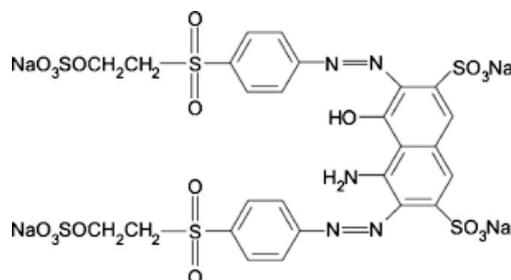
**Figura 6** - Estrutura molecular típica de corantes pré-metalizados.



**Fonte:** (BRUSCATO, 2011)

**Corantes reativos:** são corantes que apresentam um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes com os grupos hidroxilas das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas e também com grupos aminos das poliamidas. Os principais apresentam grupos azo (-N=N-) e antraquinona como cromóforos. Um exemplo é o corante Remazol Azul, CI Reactive blue220 (RB220), que apresenta em sua estrutura complexos de cobre e formazana.

**Figura 7** - Estrutura molecular típica de corante reativo.



**Fonte:** (BRUSCATO, 2011)

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes, mas sem dúvida os mais representativos e largamente utilizados são os da família dos azos corantes (KUNZ, 2002).

### 3.2.2 Aspectos ecológicos e toxicológicos

A principal via pela qual os corantes ingressam no ambiente é por meio das águas residuais. Em decorrência a sua própria natureza a presença de quantidades muito pequenas de corantes já tornam o efluente colorido, o que impede a penetração de luz solar na água, estes rejeitos diminuem a atividade fotossintética de alguns organismos, provocam distúrbios na solubilidade dos gases e causam danos nas brânquias dos organismos aquáticos. Dos mais de três mil corantes analisados quanto a sua toxicidade sobre peixes e mamíferos foi constatado que menos de 2% deles apresentam uma toxicidade considerada, sendo que os corantes básicos, em ambos os casos foram os que apresentam maior toxicidade (NIGAM et al, 2000; ZEE, 2002).

Os riscos associados à saúde humana, são diretamente relacionados ao tempo e modo de exposição, ingestão oral, sensibilização da pele, sensibilização das vias respiratórias. A análise do grau de toxicidade oral de corantes, medido por meio de 50% da dose letal (LD50) tem demonstrado que apenas um número reduzido de corantes pode apresentar toxicidade aguda (LD50 < 5g/Kg) e são encontrados particularmente nos corantes bis-azo e catiônicos. Estudos biocinéticos têm mostrado evidências de que corantes azo solúveis em água, se oralmente administrados são metabolizados na microflora intestinal e excretados mais rapidamente do que os compostos menos solúveis. Entretanto, os riscos crônicos destes tipos

de corantes e intermediários levam em consideração suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas. Nesta classe de corantes, o grupo que tem atraído maior atenção tem sido os corantes contendo a função azo-aromático como cromóforo, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente. Entretanto, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não têm cessado completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (vermelho congo) de grande potencialidade econômica (GUARATINI E ZANOMI, 1999).

### 3.3 CORANTE VERMELHO CONGO

O corante vermelho congo (VC) é largamente utilizado na indústria, devido a sua estrutura molecular complexa e estável possuir uma grande persistência no meio ambiente, se mantendo inalterado durante um longo período de tempo (SIVAKUMAR et al, 2014), o que aumenta ainda mais seu poder poluente. Devido à sua elevada solubilidade em água, esse corante confere uma forte cor ao efluente final.

A molécula do vermelho do congo, compreende um grupamento diazo que favorece a deslocalização dos elétrons na molécula e anéis aromáticos com os substituintes amino e sulfonato sódico. O Vermelho Congo é o sal sódico do ácido benzidinodiazobis-1-naftilamina-4-sulfônico, cuja fórmula molecular é  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ , com massa molar de  $696,66g.mol^{-1}$  e estrutura molecular bastante complexa contendo anéis aromáticos que dificultam ainda mais a sua degradação química. Trata-se de um corante classificado como diazo secundário por apresentar dois grupos de ligações estáveis azo ( $-N=N-$ ) (QUEIROZ et al, 2011).

### 3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES

O governo brasileiro tem adotado várias medidas que regulamentam o lançamento de efluentes em corpos receptores. Dentre as leis, destaca-se a Resolução nº. 357 do CONAMA, instituída em 17 de março de 2005, que estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos receptores. Embora não estabeleça valores máximos para o parâmetro de cor, está instituído que os efluentes não podem modificar as características originais dos

corpos receptores. Isso implica que a indústria deve desenvolver tratamento de seus efluentes *in loco* antes de despejá-los. Para o atendimento de tais requisitos, tanto as indústrias como os cientistas têm direcionado suas pesquisas na busca de tratamentos e tecnologias visando à descoloração de corantes nos efluentes.

No que diz respeito ao tratamento de efluentes coloridos, a diversidade estrutural dos corantes proporciona uma grande variedade de cores, dificultando, entretanto, a utilização de um único método no tratamento desses efluentes (FERREIRA-LEITÃO, 2000). Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na remoção de corantes em efluentes industriais. Estes métodos podem ser distribuídos em três categorias, que são químicos, físicos e biológicos (SILVA, 2011).

### **3.4.2 Métodos químicos**

Os métodos oxidativos são os métodos químicos mais utilizados, em decorrência de sua simplicidade de aplicação. A oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes. Os processos oxidativos avançados (POA) se caracterizam por transformar a grande maioria dos contaminantes orgânicos em dióxido de carbono, água e ânions inorgânicos, por meio de reações de degradação que envolvem espécies transitórias oxidantes, principalmente os radicais hidroxila. São processos limpos e não seletivos, podendo degradar inúmeros compostos, independentemente da presença de outros (TEIXEIRA E JARDIM, 2004).

A oxidação por ozônio é capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos. É um método que apresenta melhores resultados na oxidação de moléculas de corantes com dupla ligação, como os cromóforos, quebrando a dupla ligação e formando moléculas menores, resultando na redução da coloração. Essas pequenas moléculas podem ter propriedade tóxicas ou carcinogênicas, onde a ozonização aliada a um processo físico pode resolver esse problema (REIS, 2009).

### 3.4.2 Métodos físicos

Os métodos físicos consistem em técnicas de remoção resultantes de dois mecanismos: adsorção, onde o corante é fixado a um suporte, como o carvão ativado e troca iônica, influenciados por múltiplos fatores físico-químicos, tais como: interação corante/sorvente, área da superfície do sorvente, tamanho da partícula, temperatura, pH, e tempo de contato. Têm grande aplicabilidade no tratamento de efluentes têxteis, principalmente por meio da utilização de carvão ativado como adsorvente e no tratamento com membranas (ROBINSON et al., 2001).

A técnica de adsorção recentemente tem ganhado um certo favoritismo com relação aos métodos convencionais devido à sua eficiência na remoção de poluentes estáveis, produzindo um efluente de alta qualidade e é um processo economicamente viável (REIS, 2009).

Outro método é a filtração com membrana, que tem a capacidade de clarificar, concentrar e separar o corante de efluente. É resistente a temperaturas, condições químicas e biológicas adversas. É adequado para recirculação da água dentro de uma planta industrial se o efluente contém baixas concentrações de corantes, mas é incapaz de reduzir a quantidade de sólido dissolvido, o que dificulta a reutilização da água (ROBINSON, 2001).

### 3.4.3 Métodos biológicos ou biorremediação

Os métodos biológicos são os mais utilizados pelas indústrias, devido a eficiência em remediar grandes quantidades de efluentes baseado na nutrição de micro-organismos, os quais se proliferam na presença de resíduos utilizando-os como fonte de carbono e nitrogênio. Os processos de oxidação biológica podem ser de três tipos: aeróbico (lagoas de estabilização, lodo ativado), anaeróbico (reatores anaeróbicos) e misto (fossas sépticas e digestão de lodo) (REIS, 2009).

De acordo com Ballaminut (2007), a biorremediação compreende o uso de organismos vivos em tratamentos de ambientes contaminados para reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental. As tecnologias de biorremediação representadas na Tabela 1, vêm sendo indicadas para restauração de locais muito poluídos, onde a biodegradação natural

ocorre lentamente. Os métodos de aceleração desse processo podem utilizar da manipulação das condições ambientais para estimular os micro-organismos de ocorrência natural (autóctone) na degradação. Esses métodos podem ser melhorados com a inserção de micro-organismos alóctones com comprovada capacidade de metabolizar o poluente, ocorrendo no próprio local (*in situ*), ou fora dele (*ex situ*), resultando na remoção do material contaminado.

A biorremediação é um processo que combina eficiência e baixo custo, tornando-se muito interessante para o uso na “limpeza” de solos e águas. Chegando a ser 65% a 85% mais econômica que as técnicas de descontaminação e tratamento de resíduos industriais (CIB, 2004).

**Tabela 1** - Tipos de tecnologias de biorremediação (Ballaminut, 2007).

<b>Tipo de biorremediação</b>	<b>Conceitos</b>
<b>Biorremediação intrínseca</b>	A degradação dos contaminantes é feita pela microbiota autóctone, utilizando apenas os recursos disponíveis no local.
<b>Bioestimulação</b>	A otimização das condições de crescimento dos micro-organismos nativos do local contaminado, oferecendo condições que estimulem o metabolismo degradativo aos mesmos.
<b>Bioaumentamento</b>	Introdução de micro-organismos para degradação de um contaminante.
<b>Biofiltros</b>	Micro-organismos mobilizados em colunas para tratamento de ar ou efluentes líquidos.
<b>Bioventilação</b>	Introdução de oxigênio no solo para estimular a ação dos micro-organismos e evaporar o poluente.
<b>“land farming”</b>	Sistema de tratamento de resíduos e efluentes contaminados no solo.
<b>Compostagem</b>	Processo de tratamento aeróbio termófilo, onde o material contaminado é misturado a um grande volume de substrato que contém microbiota degradadora.
<b>Biorreatores</b>	Reatores onde é introduzido o micro-organismo, com controle de aeração, temperatura e outros fatores.

Os micro-organismos removem os corantes por meio de três mecanismos: biossorção, bioacumulação e biodegradação. A **biossorção** pode ser definida como uma ligação do soluto à biomassa por meio de um processo que não envolve transporte de energia metabólica. Atualmente, tem se observado um crescente interesse em termos de pesquisa de adsorção pela procura por adsorvente de baixo custo, aumentando assim o interesse por resíduos da indústria ou da mistura, além de biomassa microbiana como bactérias, fungos e algas podem ser utilizados como material adsorvente. A **bioacumulação** é definida como sendo o acúmulo de poluentes por ativação de células em crescimento por seu metabolismo (SILVA, 2015).

A grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de **biodegradação** pode ser a busca contínua de microrganismos capazes de degradar de maneira eficiente e em tempo razoável, um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. A utilização de bactérias, como *Pseudomonas sp* e *Sphingomonas sp* tem sido publicada em artigos sobre a degradação de corantes. Estes microrganismos são particularmente úteis para degradação de azocorantes, pois tem a capacidade de realizar a clivagem nas ligações azo deste tipo de composto, fato este que geralmente está associado à enzima azoredutase (BRUSCATO, 2011).

Fungos em combinação com métodos químicos também têm sido testados e se mostrado bastante eficientes na descoloração de efluentes e corantes têxteis. Os fungos ligninolíticos têm despertado grande interesse devido à diversidade de enzimas (lignina peroxidases, lacases, fenol oxidases, entre outras) por eles secretados, com ação sobre múltiplos substratos de origem industrial. Estas enzimas apresentam a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos. Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes. (FERREIRA, 2007).

### 3.5 FUNGOS BASIDIOMICETOS E ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a biodegradação de corantes, principalmente utilizando fungos basidiomicetos. Suas enzimas extracelulares microbianas são efetivas na degradação de poluentes, principalmente aquelas presentes nos basidiomicetos da podridão-branca da madeira. As enzimas do sistema lignolítico desses fungos são responsáveis pela degradação de uma grande variedade de compostos recalcitrantes. Os

fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação, como capacidade de crescer sob condições de estresse ambiental; seu modo de crescimento, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, por meio do alongamento e da ramificação das hifas, que permite a colonização de grandes áreas e o sistema de biodegradação fúngico, realizado por enzimas extracelulares. (RIBEIRO, 2013).

As enzimas responsáveis pela degradação destas moléculas são as peroxidases, como manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), lacases e fenol oxidases. Estas enzimas ligninolíticas são intra ou extracelulares e apresentam baixa especificidade para o substrato, sendo bastante interessantes para o tratamento de resíduos de características variadas como os resíduos têxteis (DELLAMATRICE et al., 2008). Estas enzimas agem como catalizadores biológicos e diminuem a energia de ativação das reações (MACHADO et al., 2006).

Fungos basidiomicetos são capazes não só de descolorir, mas também de degradar e mineralizar diferentes tipos de estruturas presentes nos corantes (azo, antraquinona, heterocíclico, trifenilmetano e corantes poliméricos), além de inúmeros outros compostos orgânicos tóxicos e recalcitrantes (MACHADO et al., 2006). Os fungos de podridão branca possuem a capacidade de degradar lignina, o que os torna o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação. O sistema que degrada extensivamente a lignina também é responsável pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos como clorofenóis, nitrofenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos. (BALLAMINUT, 2007).

### 3.6 DEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR BASIDEOMICETOS

O uso de fungos para o tratamento de efluentes é muito promissor, uma vez que tais micro-organismos possuem um aparato metabólico que libera enzimas não específicas que possuem alto poder oxidativos, facilitando a degradação dos compostos presentes no efluente, sendo o grupo Basidiomicete o mais visado pela biotecnologia, pelo fato de possuírem alto potencial de recuperação de ambientes degradados, chegando ao percentual de remoções de corante no valor de 89%. (KAMIDA et al., 2005; CUNHA et al., 2012). Segundo Melo et al. (2014), em experimento com o fungo basidiomiceto há superioridade de adsorção/degradação do corante Vermelho Congo pelo fungo *Lentinus crinitus* em cultivo sem agitação.

A utilização de fungos ligninolíticos em bioprocessos envolvendo descontaminação ambiental, principalmente basidiomicetes degradadores da podridão branca, vem crescendo grandemente nos últimos tempos, no que se refere à utilização de sistemas enzimáticos, devido às suas vantagens. Entre essas vantagens pode-se destacar a diminuição de compostos tóxicos durante o processo de descontaminação, uma vez que se trata de um processo natural, não necessitando de substâncias químicas. Fungos basidiomicetos como o *Lentinus crinitus* mostraram-se eficientes em processos de biodegradação e descoloração de efluentes têxteis (SOUZA E ROSADO, 2009).

### 3.7 UTILIZAÇÃO DE SACAROSE NOS PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO

Estudos realizados com utilização de sacarose como condição experimental para a biodegradação de corantes por fungos de podridão branca, indicaram uma otimização dos experimentos. Em que verificou-se que na ausência de sacarose não houve biodegradação do corante, indicando que o fungo não foi capaz de utilizar os corantes como única fonte de carbono e energia (MARTINS et al., 1999).

### 3.8 MEDIADORES ENZIMÁTICOS

Mediadores são moléculas de baixa massa molecular que estão indiretamente envolvidas na reação enzimática. Ao permitirem alargar o espectro de substratos em que a enzima atua, vieram dar um novo aspecto à ação das enzimas em geral e da lacase em particular. Os fungos de degradação branca segregam um conjunto de compostos juntamente com as enzimas oxidativas, que se sabem ser os mediadores necessários à ação das enzimas. Um mediador químico da lacase é geralmente um intermediário fortemente oxidável. Vários autores sistematizaram as características que devem ter um bom mediador: ser um bom substrato da lacase; deve ser estável; não devem inibir a reação enzimática; a sua forma oxidada deve ter uma meia vida suficientemente longa permitindo a sua difusão no substrato; possuir um potencial de oxidação alto (ALVES, 2011). Mais de 100 possíveis mediadores tem sido descritos, mas o mais comum é o ABTS, o primeiro mediador referido para a lacase (SOARES, 2000).

### 3.9 INDUTORES ENZIMÁTICOS

De acordo com Alves (2011), a produção de lacase pode ser aumentada por adição de indutores à cultura de fungos. O cobre é um componente essencial da lacase e a suplementação aumenta a sua síntese numa grande variedade de fungos. Estudos realizados com cultura de *Magnaporthe grisea*, indicam que a adição de sulfato de cobre como indutor aumentou 8 vezes a atividade da lacase. Além do cobre outros metais como ferro e cálcio tem capacidade de induzir a atividade da lacase. Grandes quantidades de manganês também mostraram induzir a produção de lacase.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Sumé – Paraíba.

### 4.2 MICRO-ORGANISMO

Para realização das atividades foi utilizado o microorganismos pertencente ao Reino: Fungi, Filo: Basidiomycota, Classe: Basidiomycetes, Ordem: Polyporales, Família: Polyporaceae, Gênero: *Lentinus*, Espécie: *Lentinus crinitus* 2611, visualizado na figura 8, cedido da Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica (IBt) da Secretaria de Meio Ambiente do estado de São Paulo.

**Figura 8** - Fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 cultivado em meio MEA (2%) repicado em placa de Petri com aproximadamente 7 dias.



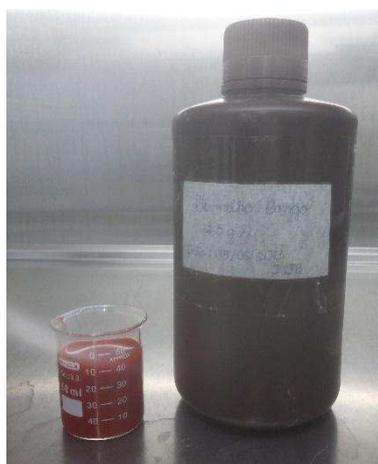
**Fonte:** Imagem capturada pela pesquisadora.

O cultivo do isolado foi feito a 28°C em ágar extrato de malte - MEA (2%), constituído de extrato de malte 2%, peptona 0,1% e ágar 1,5%.

### 4.3 CORANTE

O corante utilizado foi o Vermelho Congo, visualizado na figura 9, cuja fórmula molecular é  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ , apresentando massa molar de 696,66 e solução vermelha. Partiu de solução estoque de concentração 2,5 g/L.

**Figura 9** - Corante Vermelho Congo na concentração de 2,5 g/L



**Fonte:** Imagem capturada pela pesquisadora.

### 4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

#### 4.4.1 Meio líquido para avaliação da descoloração

Para avaliação da descoloração do corante Vermelho Congo em meio líquido foi usado caldo de batata 200 g/L, previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e distribuído em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo sacarose nas concentrações de 0, 2,5 e 5%, Sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) nas concentrações de 0, 1 e 2 mM e corante na concentração de 20 mg/L. Como controle foi utilizado o mesmo sistema, na ausência do inoculo microbiano. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foram retirados pedaços correspondentes a 1/8 das placas contendo fungo previamente cultivado por 10 dias e transferido, em condições assépticas, para frascos contendo 100 mL de caldo de batata nas diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre, com 20 mg/L de corante, como demonstrado na figura 10.

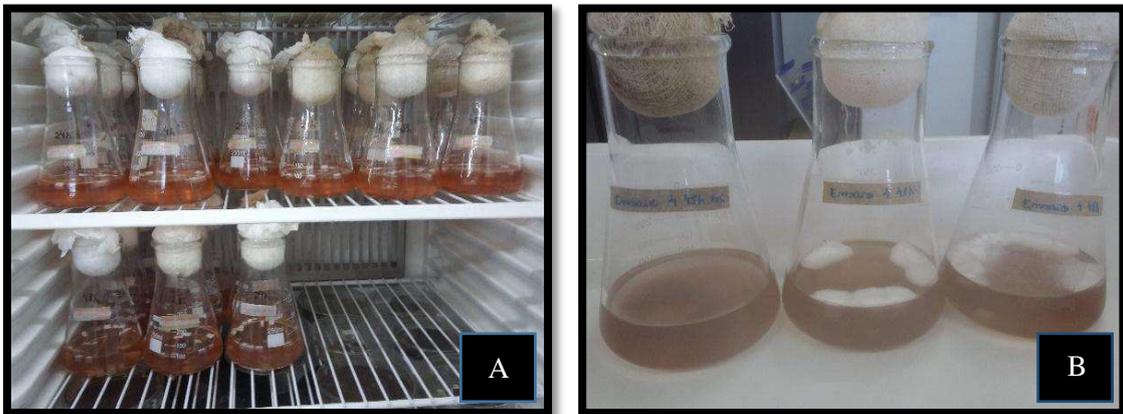
**Figura 10** - (A) Cortes correspondentes a 1/8 da placa; (B) Micro-organismos inoculados no meio de cultura contendo o corante.



**Fonte:** Imagem capturada pela pesquisadora.

Os frascos foram incubados em cultivo sem agitação por 96 horas a 28°C. O cultivo foi interrompido com 24, 48, 72 e 96 horas para coleta e análise de dados representado na Figura 11.

**Figura 11** - (A) Cultivo em incubadora; (B) Cultivo após 48 horas na incubadora.



**Fonte:** Imagem capturada pela pesquisadora.

#### 4.4.2 Obtenção de filtrado

A obtenção do filtrado foi realizada por meio de filtração a vácuo utilizando papel filtro com poro de 0,25 µm.

#### 4.4.3 Descoloração do meio e aferição do pH

O filtrado foi empregado para aferição do pH com o auxílio de fitas de pH e da absorbância para avaliação de descoloração do corante. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A leitura da absorbância do filtrado das amostras foi realizada em espectrofotômetro Instrutherm UV – 1000A, e utilizada para inferir a descoloração em cultura realizada pelo fungo. O comprimento de onda utilizado neste trabalho para leitura de absorbância foi realizado com base na absorbância máxima  $\lambda$  (nm) do corante em estudo (MANCHILA, 2006). A porcentagem de descoloração em cultura foi calculada de acordo com a Equação 1 (BRUSCATO, 2011; SILVA, 2015).

$$\% \text{ de descoloração} = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad (1)$$

Sendo:

Aamostra: absorbância a 480 nm do sobrenadante;

Acontrole: absorbância a 480 nm do sobrenadante de culturas sem o inóculo fúngico.

#### 4.4.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada por meio da oxidação do ABST (ácido 2,2' – azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico), medida por variação de absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 6 minutos, em espectrofotômetro Instrutherm UV – 1000A, seguindo o método descrito por Ballaminut (2007). A mistura de reação está expressa na Tabela 2. Uma unidade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar  $1\mu\text{Mol}$  de ABST por minuto.

**Tabela 2** - Concentrações da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µl)</b>
Tampão acetato de sódio (50mM)	450
ABST (5mM)	150
Extrato enzimático	900

**Fonte:** (Ballaminut, 2007)

#### 4.4.5 Crescimento fúngico em meio líquido

A determinação do crescimento fúngico em meio líquido foi realizada pela análise de biomassa obtida por filtração a vácuo, que foi incubada em estufa a 60°C, por 96 horas, em papel filtro de poro 0,25 µm, seguida de aferição por gravimetria (SILVA, 2015).

A biomassa foi determinada pela Equação 2.

$$X = Massa\ 2 - Massa1 \quad (2)$$

Sendo:

X: Valor da Biomassa;

Massa 2: Média do papel filtro com células;

Massa 1: Média do papel filtro sem células.

#### 4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A realização dos ensaios foi estruturada por planejamento experimental fatorial completo 2<sup>2</sup> acrescido de três pontos centrais para aumento de reprodutibilidade, totalizando 7 ensaios de forma aleatória. Por meio do planejamento, as variáveis analisadas foram: sacarose e sulfato de cobre. As variáveis e os níveis dos ensaios são mostrados na Tabela 3 e a matriz do planejamento na Tabela 4.

Para montagem de planilhas e plotagem de gráficos foram utilizados os softwares Microfost Office Excel 2013, Origin 8 e Statistica® 8.0 (marca registrada da StatSoft).

**Tabela 3** - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial

Variável	-1	0	1
Sacarose (%)	0	2,5	5
Sulfato de Cobre (mM)	0	1	2

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

**Tabela 4** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com três repetições no ponto central

Ensaio	Variáveis	
	Sacarose (%)	Sulfato de cobre (mM)
1	-1 (0)	-1 (0)
2	+1 (5)	-1 (0)
3	-1 (0)	+1 (2)
4	+1 (5)	+1 (2)
5	0 (2,5)	0 (1)
6	0 (2,5)	0 (1)
7	0 (2,5)	0 (1)

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

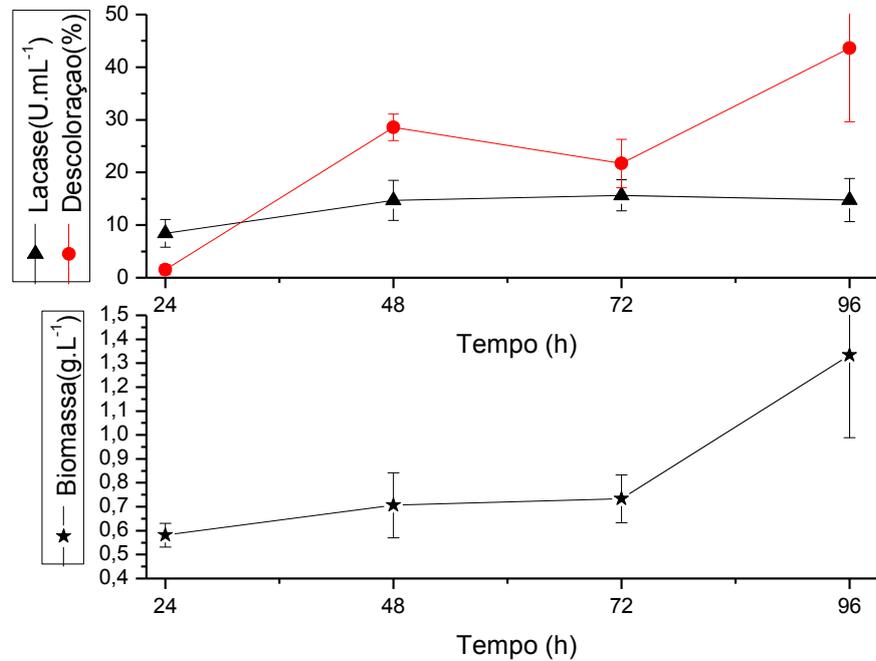
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Neste item é apresentado a relação entre as atividades enzimáticas, descoloração e biomassa, de cada ensaio contendo diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre em que o fungo foi cultivado, no período de até 96 horas.

No Gráfico 1 é mostrado o perfil da atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante na concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup>, com 0 % de sacarose e 0mM de Sulfato de cobre.

**Gráfico 1** - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , com 0 % de sacarose e 0mM de Sulfato de cobre

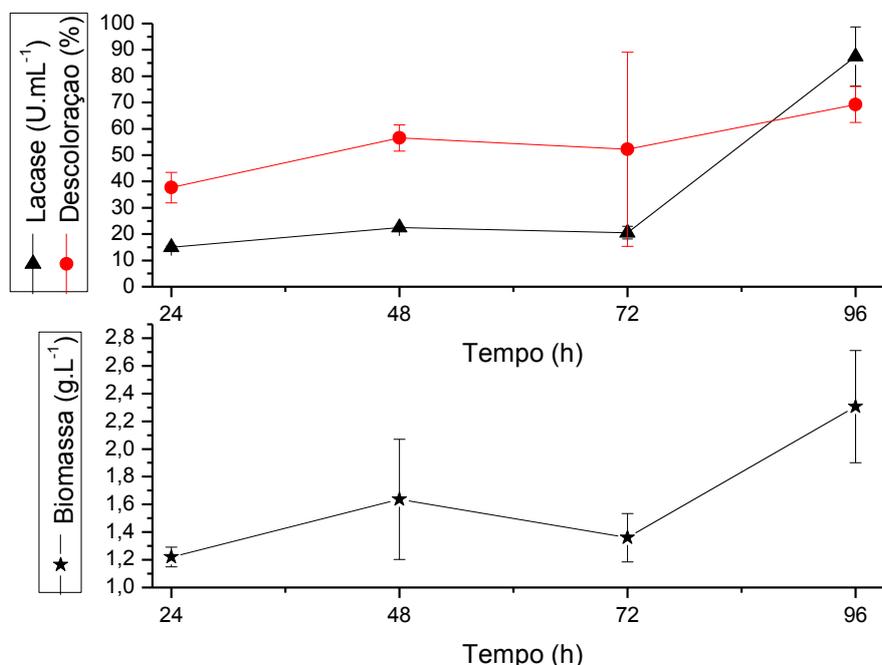


**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

A partir de 24 horas já é possível observar a ocorrência de atividade de lacase, que se manteve até 72 horas, momento em que verificou-se o pico de atividade atingindo o valor de  $15,66 \text{ U.mL}^{-1}$ , às 96 horas do cultivo percebe-se um desvio de atividade de lacase. A descoloração permanece crescente sendo que com 96 horas atingiu o pico de  $43,62\%$  de descoloração. O crescimento fúngico segue apresentando pouca variação nos instantes de 48 e 72 horas, e atinge o máximo crescimento de  $1,33 \text{ g.L}^{-1}$  em 96 horas. O pH do ensaio se manteve constante em 6 até 48 horas, reduzindo para 5 em 72 horas, e em 96 horas voltou ao valor inicial.

No Gráfico 2 é mostrado o perfil da atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao Ensaio 2 em que o fungo foi cultivado na presença do corante na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  com 5 % de sacarose e 0mM de Sulfato de cobre.

**Gráfico 2** - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  com 5 % de sacarose e  $0 \text{ mM}$  de Sulfato de cobre

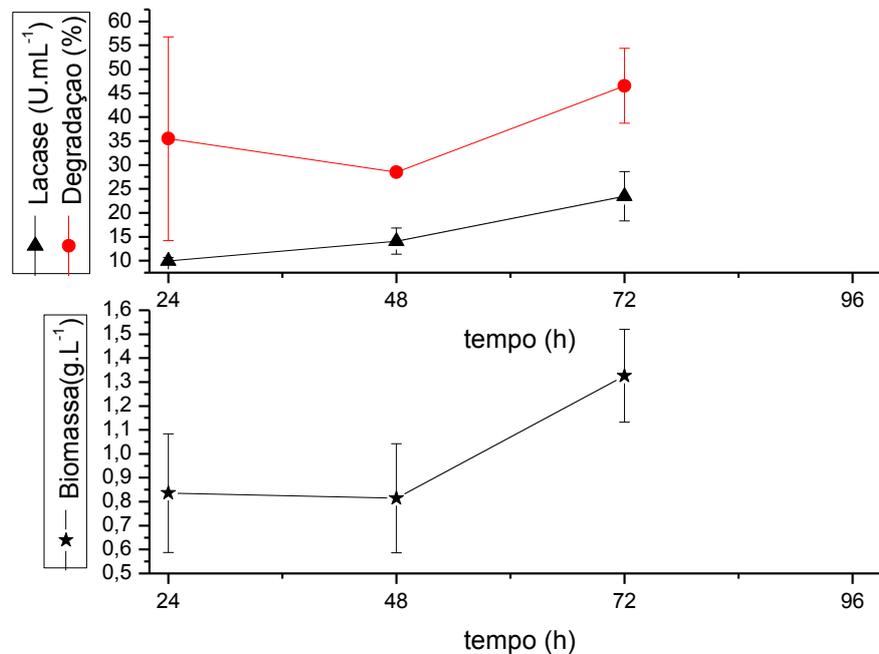


**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

No Ensaio 2 pode-se observar que a atividade enzimática se manteve crescente até 48 horas, alcançando o pico de  $87,464 \text{ U.mL}^{-1}$  com 96h. O mesmo perfil foi verificado para descoloração e os valores de biomassa, obtendo-se o pico de 69,24 % e 2,3g/L em 96 horas, respectivamente. O pH se manteve crescente em 5, 6,0 e 6,5 até as 72 horas de cultivo, caindo para o pH 6,0 no instante de 96 horas. Este resultado corrobora com obtido por Bruscatto (2011), que observou a produção de lacase utilizando fungos endofíticos com 10 dias de cultivo em meio líquido, na presença de fontes de carbono e nitrogênio que atuaram como indutores enzimáticos.

No Gráfico 3 encontra-se o perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante vermelho congo na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  com 0 % de sacarose e  $2 \text{ mM}$  de Sulfato de cobre.

**Gráfico 3** - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante vermelho congo na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  com 0 % de sacarose e 2mM de Sulfato de cobre

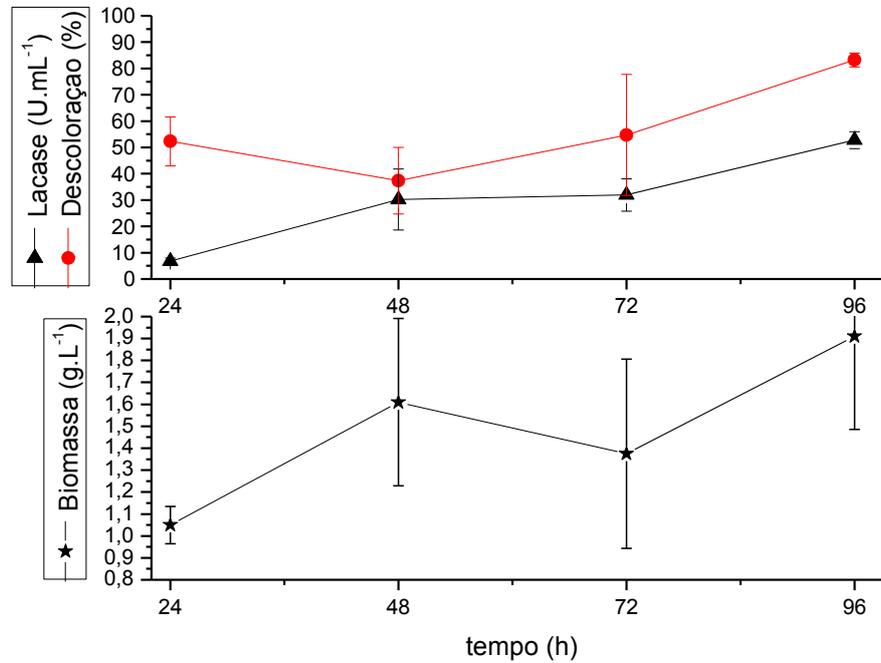


**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

No Ensaio 3, a partir de 24 horas pode-se observar uma crescente atividade enzimática, chegando ao valor máximo de  $23,48 \text{ U.mL}^{-1}$  em 72 horas de cultivo. O instante de 96 horas não foi analisado, pois apresentou contaminação. A porcentagem de descoloração e o valor de biomassa mantiveram-se estáveis até 48 horas de cultivo, apresentando um aumento no instante de 72 horas. Atingindo os valores de 46,552% e  $1,326 \text{ g/L}$ , respectivamente. O pH se manteve estável no valor de 5.

No Gráfico 4 observa-se o perfil da análise do Ensaio 4, mostrando a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante vermelho congo na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  com 5 % de sacarose e 2mM de Sulfato de cobre.

**Gráfico 4** - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante com 5 % de sacarose e 2mM de Sulfato de cobre

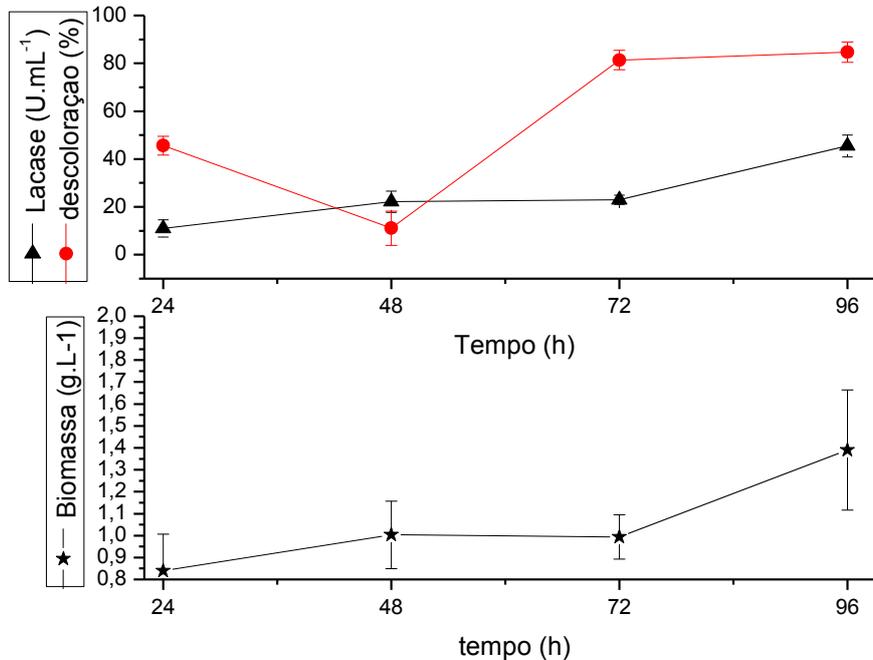


**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

Neste ensaio, ocorreu a adição das maiores concentrações de sacarose e sulfato de cobre, sendo que a produção de lacase se deu de forma crescente, chegando ao pico de atividade com  $52,767\text{U.mL}^{-1}$  com 96 horas de cultivo. A partir de 24 horas de incubação a descoloração foi crescente tendo – se alcançado valor máximo de 83,22 % em 96 horas. A biomassa foi crescente, sendo que o pico foi de 1,91g/L em 96 horas de cultivo. O pH iniciou em 5,5, apresentou uma queda para 5 em 48horas, e em72 horas. No instante de 96 horas voltou a ser observado o valor de 5,5.

No Gráfico 5 encontra-se o perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante vermelho congo na concentração de  $20\text{ mg.L}^{-1}$  com 2,5 % de sacarose e 1mM de Sulfato de cobre, representando as médias dos pontos centrais.

**Gráfico 5** - Perfil da análise entre a atividade enzimática, descoloração e biomassa referente ao cultivo do fungo na presença do corante com 2,5 % de sacarose e 1mM de Sulfato de cobre, representando a média dos pontos centrais



**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

Neste ensaio, pode-se observar um aumento na atividade de lacase até o instante de 96 horas, chegando ao valor máximo de 45,46 U.mL<sup>-1</sup>. A porcentagem de descoloração apresentou uma queda em 48 horas de cultivo, seguindo de aumento com 72 horas, que se manteve até às 96 horas por volta de 84,73%. A biomassa, da mesma forma que a atividade enzimática, apresentou –se crescente aumento, chegando a 1,39g.L<sup>-1</sup> de crescimento. O pH se manteve constante no valor de 6. Estes resultados corroboram com Kamida et al. (2005), que observou atividade de lacase com pico de produção de 15 U/L, aos 9 dias de incubação do fungo *Pleurotus sajor-caju* na presença do corante índigo. Sendo que, neste trabalho, a atividade de lacase foi identificada em apenas 24 horas de cultivo.

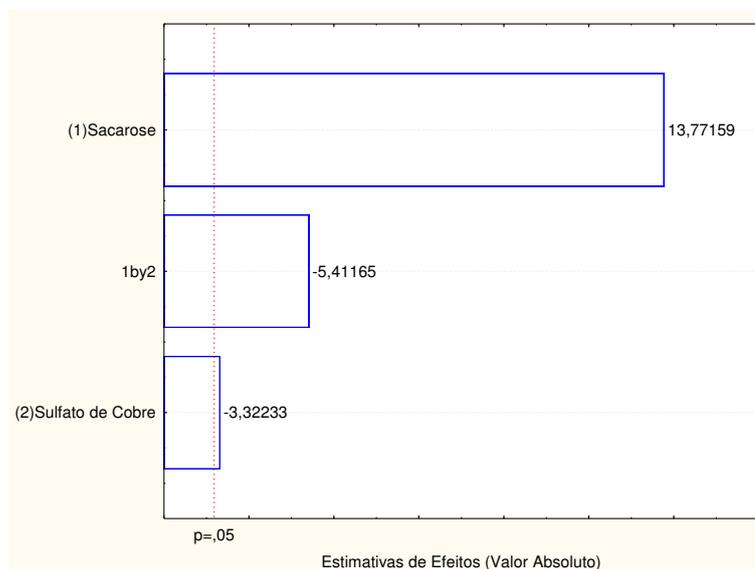
A Tabela 5 indica os valores de produção enzimática nos diferentes ensaios em que o fungo foi submetido.

**Tabela 5** - Atividade enzimática dos ensaios do planejamento

Ensaio	Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> )			
	24h	48h	72h	96h
1	8,42 ± 2,65	14,70 ± 3,81	15,66 ± 2,97	14,75 ± 1,33
2	14,97 ± 0,49	22,43 ± 0,32	20,51 ± 2,41	87,46 ± 11,22
3	9,93 ± 0,7	14,09 ± 2,72	23,48 ± 5,16	-
4	6,80 ± 1,19	30,17 ± 11,58	31,95 ± 6,13	52,77 ± 3,20
PC	10,94 ± 3,62	22,15 ± 4,46	22,06 ± 1,91	45,46 ± 4,58

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

O Diagrama 1, representa os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis sacarose e sulfato de cobre, bem como as interações entre as variáveis na atividade de lacase. Na Figura verifica-se que todas as variáveis, bem como a interação entre elas influenciaram a resposta de atividade enzimática.

**Diagrama 1** - Diagrama de Pareto para variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta atividade enzimática

**Fonte:** Construído com os dados da pesquisa

O Ensaio 1 apresentou os menores valores de produção de enzima, descoloração e biomassa. O que pode ser atribuído a ausência dos indutores enzimáticos. O Ensaio 2 apresentou o maior valor de produção de lacase e crescimento fúngico.

Neto (2012) alcançou os valores de atividade de lacase na degradação de efluentes têxteis de 168, 165 e 61 U/L, para os fungos *Pleurotus ostreatus* CCIBt2781, *Trametes villosa* CCIBt2502 e *Trametes villosa* CCIBt2628, respectivamente. Em muitos estudos não se encontraram evidências experimentais que forneçam um modelo generalizado do envolvimento de enzimas lignolíticas na descoloração de corantes por culturas de basidiomicetos (NETO, 2012). Ballaminut (2007), detectou em seu trabalho a presença de enzimas peroxidases de extratos do fungo *Lentinus crinitus* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, com até 30 dias de incubação, e atividades máximas de lacases e peroxidases dependentes de manganês, com 10 dias de cultivo.

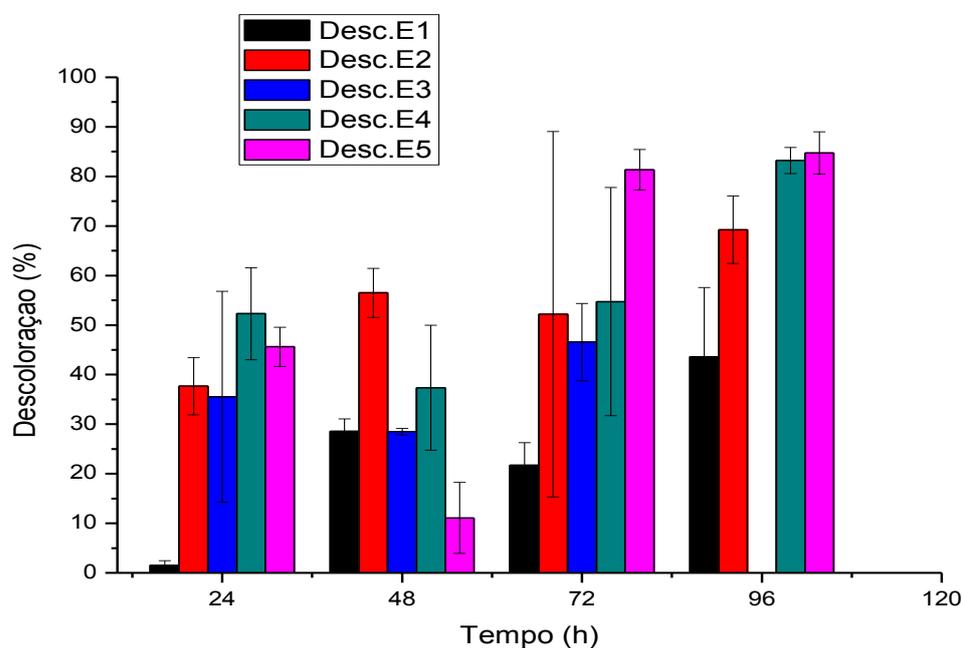
De acordo com Paranhos (2011), o pH alcalino no emprego de fungos basidiomicetos no tratamento de efluentes é um fator agravante. Os fungos em cultura, geralmente apresentam bom crescimento em pH entre 5 e 7. Este dado se confirma entre os valores de pH encontrados neste estudo, sugerindo que a produção de enzima foi obtida com níveis de pH ideais.

As enzimas atuantes no sistema lignolítico demonstram um pH ótimo de atividade que, de maneira geral, situa-se entre 3,5 e 7 (PARANHOS, 2011). Almeida (2008) em seu estudo, na biodegradação de corantes azóicos, pôde observar que o corante *Acid Yellow 25* apresentou o melhor resultado no pH 4,5 com 77,57% de remoção de cor após três horas de contato.

## 5.2 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SULFATO DE COBRE NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE

O Ensaio 1 apresentou os menores valores de descoloração. Os demais ensaios apresentaram descolorações de moderada a alta. As maiores porcentagens foram obtidas no Ensaio 2 entre 48 e 96 horas e nos ensaios 4 e 5 entre 72 e 96 horas. Os Ensaios 3, 4 e 5 indicaram uma queda na descoloração no período de 48 horas, seguida de aumento posterior.

Analisando o Gráfico 6 e a Tabela 6, pode-se observar porcentagens de descoloração máximas de 69,24%, 83,22% e 84,70%, nos Ensaios 2, 4 e 5, todas no período de 96 horas. Enquanto que no Ensaio 1 foi obtido uma porcentagem máxima de 43,62% com 96 horas e no Ensaio 3 foi obtido 46,55% com 72 horas. A remoção de corante variou de 1,53% em 24 horas do Ensaio 1 até 84,7% em 96 horas do Ensaio 5.

**Gráfico 6** - Representação da porcentagem de descoloração do Vermelho Congo

\*E5 média dos pontos centrais. **Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

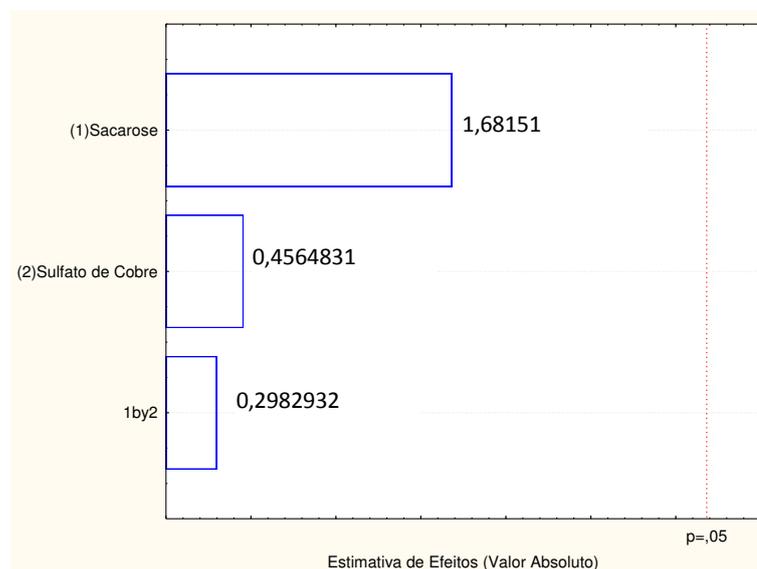
**Tabela 6** - Porcentagem de descoloração do corante em cada ensaio, em cultivo de 96 horas

Ensaio	Descoloração (%)			
	24h	48h	72h	96h
1	1,53 ± 0,93	28,58 ± 2,50	21,70 ± 4,59	43,62 ± 13,97
2	37,65 ± 5,75	56,50 ± 4,96	52,20 ± 36,87	69,24 ± 6,83
3	35,50 ± 21,29	28,51 ± 0,66	46,55 ± 7,80	-
4	52,28 ± 9,29	37,34 ± 12,62	54,73 ± 23,01	83,22 ± 2,63
PC	45,61 ± 3,93	11,07 ± 7,156	81,36 ± 4,1	84,70 ± 4,25

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

O Diagrama 2, representa os efeitos estimados em ordem decrescente de magnitude, das variáveis sacarose e sulfato de cobre, bem como suas interações na descoloração do corante. Nenhum dos efeitos foram significativos para a resposta de descoloração. Com base nas análises, nenhuma das variáveis, influenciaram a resposta de descoloração do corante na presença do fungo *Lentinus crinutus*.

**Diagrama 2** - Diagrama de Pareto para variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta descoloração



**Fonte:** Construído com os dados da pesquisa

Silva (2015), observou em seu trabalho uma remoção do corante Vermelho Congo máxima de 34,24% na concentração de 20mg/L, sem uso de indutores para atividade enzimática, no instante de 24 horas, com um posterior decréscimo. De forma diferente, neste trabalho foi utilizado indutores para a atividade enzimática e os valores de descoloração foram consideravelmente maiores nos ensaios com os mesmos.

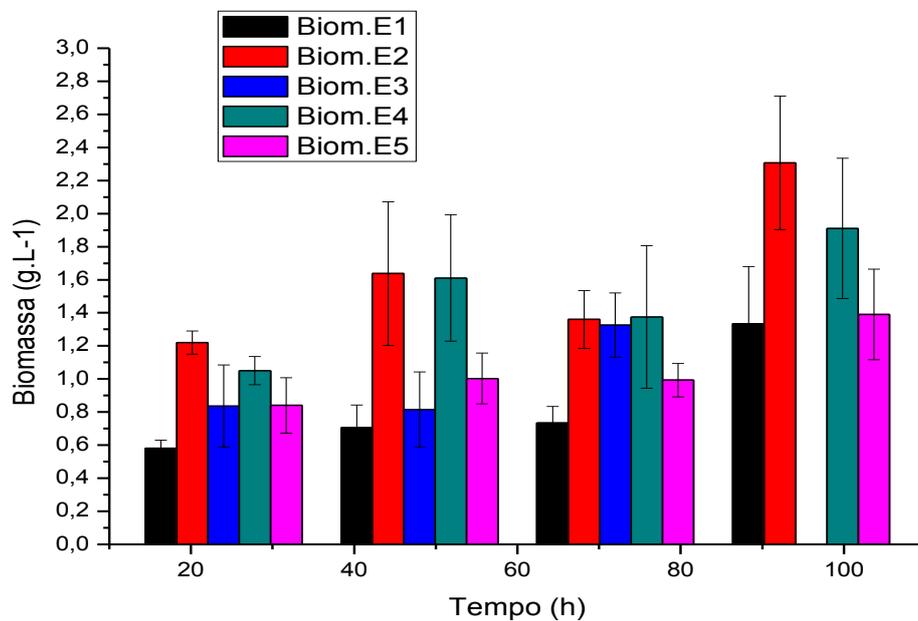
Pereira et al. (2010), demonstrou um percentual de 77% de degradação do corante RBBR (Remazol Brilliant Blue), utilizando o fungo de podridão branca, *Geothricum candidum*, no cultivo sem agitação. Melo et al. (2014), obteve no regime sem agitação, utilizando o fungo *Lentinus crinitus* para degradação do corante Vermelho congo, a maior adsorção do corante com 60,8%.

### 5.3 CRESCIMENTO FÚNGICO

De um modo geral o micro-organismo apresentou um bom crescimento. Analisando o Gráfico 7, pode-se notar que os ensaios 2,4 e 5, atingiram os valores máximos de 2,30, 1,91 e 1,39g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os Ensaios 1 e 3, alcançaram o valor máximo de 1,33g.L<sup>-1</sup> nos instantes de 96 e 72 horas, respectivamente, podendo ser explicado pelo fato de não estarem

suplementados com a sacarose. Diante disso, nota-se que o fungo *Lentinus crinitus* consegue manter seu crescimento na concentração de corante em que foi submetido e tolera a exposição demorada nas diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre, mantendo um crescente aumento de biomassa. No entanto, o mesmo obteve menor crescimento no Ensaio 1, onde não foi suplementado. Tal comportamento demonstra que a falta de sacarose no meio pode interferir no crescimento do fungo.

**Gráfico 7** - Representação da biomassa fúngica nos diferentes ensaios



\* E5 média dos pontos centrais.

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

Na Tabela 7 encontra-se a biomassa fúngica nas diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre.

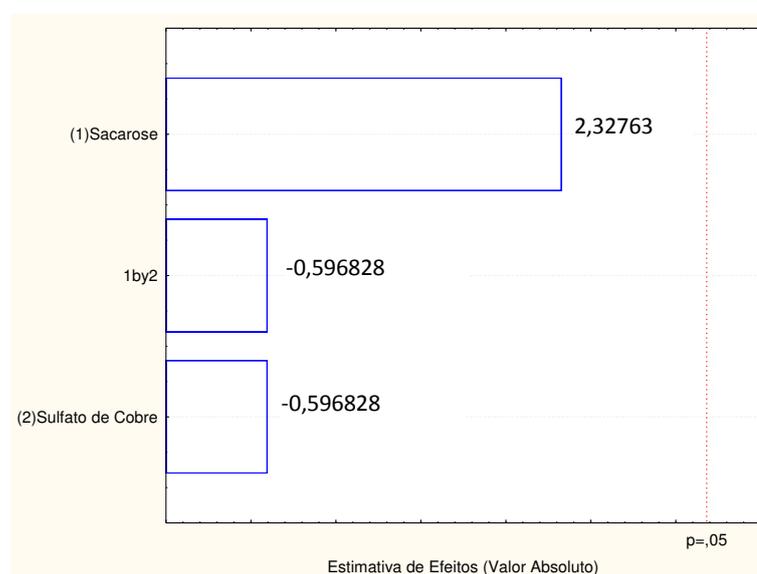
**Tabela 7** - Biomassa fúngica nos diferentes ensaios

Ensaio	Crescimento fúngico (g.L <sup>-1</sup> )			
	24h	48h	72h	96h
1	0,58 ± 0,05	0,70 ± 0,14	0,73 ± 0,1	1,33 ± 0,35
2	1,22 ± 0,07	1,64 ± 0,43	1,36 ± 0,17	2,31 ± 0,40
3	0,84 ± 0,25	0,81 ± 0,23	1,33 ± 0,19	-
4	1,05 ± 0,08	1,61 ± 0,38	1,38 ± 0,43	1,91 ± 0,42
5*	0,84 ± 0,17	1,00 ± 0,15	0,99 ± 0,10	1,39 ± 0,27

\* média dos pontos centrais

**Fonte:** Construída com os dados da pesquisa

De acordo com o Diagrama 3, observa-se os efeitos estimados das variáveis sacarose e sulfato de cobre, bem como suas interações no crescimento fúngico, nenhuma das variáveis foram significativas para a resposta de crescimento fúngico. Com base nessas análises, nenhuma das variáveis influenciaram a resposta de crescimento do fungo *Lentinus crinitus*.

**Diagrama 3** - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes sacarose e sulfato de cobre na resposta crescimento fúngico

**Fonte:** Construído com os dados da pesquisa

Melo et al. (2014), apresentou no cultivo sem agitação, utilizando o fungo *Lentinus crinitus* para degradação do corante Vermelho congo, uma quantidade de biomassa máxima

de 0,031g. Neto (2012), observou os valores de biomassa de 0,78, 0,93 e 0,96g/L na degradação de efluentes têxteis dos fungos *Pleurotus ostreatus* CCIBt2781, *Trametes villosa* CCIBt2502 e *Trametes villosa* CCIBt2628, respectivamente, em sete dias, 25<sup>o</sup>C. Niebisch (2009), avaliou o potencial de biodegradação do corante têxtil Remazol Azul Brilhante pelo fungo *Lentinus crinitus*, verificou que a presença do corante inibiu o crescimento do micro-organismo em cerca de 50% independente da concentração analisada. Neste trabalho, não houve inibição, tal fato pode ser atribuído à suplementação utilizada no cultivo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 se mostrou promissor na descoloração do corante Vermelho Congo em meio líquido estacionário por descolorir quase a totalidade do mesmo na concentração de 20mg/L na presença de indutores enzimáticos.
- O crescimento do fungo demonstrou que o mesmo consegue manter o crescimento na concentração de corante em que foi submetido e tolera a exposição demorada nas diferentes concentrações de sacarose e sulfato de cobre, mantendo um crescente de biomassa.
- A produção da enzima lacase se deu de forma positiva diante da presença dos indutores enzimáticos, apresentando a maior produção em 96 horas de cultivo nos ensaios contendo os indutores.

## **7 EXPECTATIVAS FUTURAS**

Avaliar a descoloração do corante Vermelho Congo pelo fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611 com a presença de indutores enzimáticos em um tempo maior de cultivo visando uma maior produção de enzima e de percentual de descoloração. Analisar a produção de enzimas ligninas peroxidases (LiP) e peroxidases dependentes de manganês (MnP) nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, M.R; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.
- ALLEGRE, C. et al. Treatment and reuse of reactive dyeing effluents. **Journal of Membrane Science**, v. 269, p. 15-34, 2006.
- ALMEIDA, A.C.M.D. **Estudo da biodegradação de corantes azoicos por inóculo proveniente de biodigestor anaeróbio de alimentos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, 2008.
- ALVES, A. L. **Produção, purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) M. P. Christ**. Dissertação (mestrado em Biologia Clínica Laboratorial) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2011.
- BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo**. 2007. 176f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.
- BRUSCATO, E.C. **Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil**. Pós Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.
- CIB – CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Nova tecnologia limpa o meio ambiente de forma natural**, 2004. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/biotech08.pdf>> Acessado em 10/05/2016.
- CONAMA. **Resolução do CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente, 2005.
- CUNHA, A.L. et al. **Degradação de corante azo por *Phanerochaete chrysosporium* em sistema de reatores em bateladas sequenciais operados em série**. Congresso Norte/Nordeste de pesquisa e inovação. Palmas, 2012.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R.; BALAN, D. S. L. **Biodegradação de corantes têxteis**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 323-338, 2005.

FERREIRA, L.S. **Biodegradação por fungos endofíticos e isolados do ambiente.** Monografia em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

FERREIRA-LEITÃO, V. S. **Estudo da degradação do azul de metileno e do azure B e obtenção preferencial de derivados n-desmetilados usando lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*.** Tese de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP).** 2006, 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

GONDIM, A. L. N.; BARBOSA, A. P. A.; PAZ, M. C. F. **Remoção biológica de corantes têxteis por meio do consórcio bacteriano entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986.** In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, n. 2, João Pessoa - PB, 2007.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Revista Química Nova**, v. 1, n. 23, p. 71-78, São Paulo, 1999.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Revista Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-79, São Paulo, 2000.

KAMIDA, H.M. et al. Biodegradação de efluentes têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química nova**. V.28, p. 629-632, 2005.

KAUSHIK, P., MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International** 35 (2009) 127–141, 2008.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

MACHADO, K. M. G. et al. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 481-487, 2006.

MANCHILA, L.S.L. **Seleção de basidiomycetes coletados e isolados em área de mata Atlântica – PE, com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos.** 2006. 130f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.

MARTINS, M.A. et al. **Estudos de biodegradabilidade de corantes azo de aplicação têxtil por *Phanerochaete chrysosporium*.** Universidade Nova de Lisboa. Braga, 1999.

MELO, G.G. et al. Estudos preliminares sobre atividade adsorptiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus*. In: **I Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos**. Sumé-PB, 2014.

NETO, S.L.M. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinérea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. Tese (doutorado) Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena-SP, 2012.

NIEBISCH, C.H. **Biodegradação do corante têxtil Remazol Azul por *Lentinus crinitus*, *Leptista sórdida* e *Hydnopolyporus***. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

NIGAM, P. et al. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-absorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 219-226, 2000.

PARANHOS, A.N.S. **Estudos dos compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2011.

PEREIRA, A.R.B. et al. **Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

QUEIROZ, B. P. V.; STEFANELLI, T. **Biodegradação de Corantes Têxteis por *Anabaena flos-aqual***. Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal, v.8, n. 1, p.026 -035, jan./mar. 2011.

QUEIROZ, M.T.A. et al. Produção Mais Limpa: Fenton Homogêneo no Tratamento de Efluentes Têxteis. **VIII Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia**, 2011.

REIS, L.G.T. **Degradação do Corante Vermelho Congo em Solução Aquosa Por meio de Plasma Obtido por Eletrólise de Alta Tensão**. 2009. 114f. Dissertação (Mestrado em agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

RIBEIRO, A.P.A. **Efeito de fungos basidiomicetos na descoloração e fitotoxicidade de corante sintético e efluente têxtil.** Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

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

SILVA, D. P. D. **Efeito da Concentração do Corante Vermelho Congo na Degradação/Adsorção pelo Fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.** Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos). Universidade Federal de Campina Grande. Sumé, 2015.

SILVA, M. C. **Degradação de Corantes e Remediação de Efluentes Têxteis por Extrato Bruto de Peroxidase de Nabo.** 2011. 136f. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobiotecnologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SIVAKUMAR, V. et al. Removal of Congo Red Dye Using an Adsorbent Prepared from *Martynia annua*, L. Seeds. **American Chemical Science Journal**, 2014.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de Sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis.** 2000. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) – Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2000.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetos em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em agronegócios e meio ambiente**. v.2, p. 121-139, 2009.

SOUZA, C.R.L.; ZALMORA, P.P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química nova**, v. 28, n.2, p. 226-228, 2005.

TEIXEIRA, C.P.A.B; JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados: conceitos básicos.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ZANONI, M.V.B.; CARNEIRO, P.A. **O descarte dos corantes têxteis.** Ciência Hoje, v. 29, p. 61-65, 2001.

ZEE, F.P. **Anaerobic azo dye reduction.** Tese de doutorado, p. 142, Wageningen, Holanda: Wageningen University Research Center, 2002.