



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

MARIA ALICE DE MELO PINHEIRO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO EXTRATO
BRUTO DE *L. CRINITUS* NA DESCOLORAÇÃO *IN VITRO* DO
CORANTE VERMELHO CONGO**

**SUMÉ - PB
2018**

MARIA ALICE DE MELO PINHEIRO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO EXTRATO
BRUTO DE *L. CRINITUS* NA DESCOLORAÇÃO *IN VITRO* DO
CORANTE VERMELHO CONGO**

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 Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professor Dr^a Glauciane Danusa Coelho.

**SUMÉ - PB
2018**

P654p Pinheiro, Maria Alice de Melo.
Produção, caracterização e aplicação do extrato bruto de *L. crinitus* na descoloração *in vitro* do corante vermelho congo. / Maria Alice de Melo Pinheiro. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

70 f.

Orientador: 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. Enzimas ligninolíticas. 2. Biorremediação. 3. Lacase. 4. Degradação de corantes. 5. *Lentinus crinitus*. 6. Fungos basidiomicetos. 7. Corantes têxteis. 8. Vermelho congo. 9. Micologia. 10. Biotecnologia. 11. Atividade enzimática. I. Título.

CDU: 604.4 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

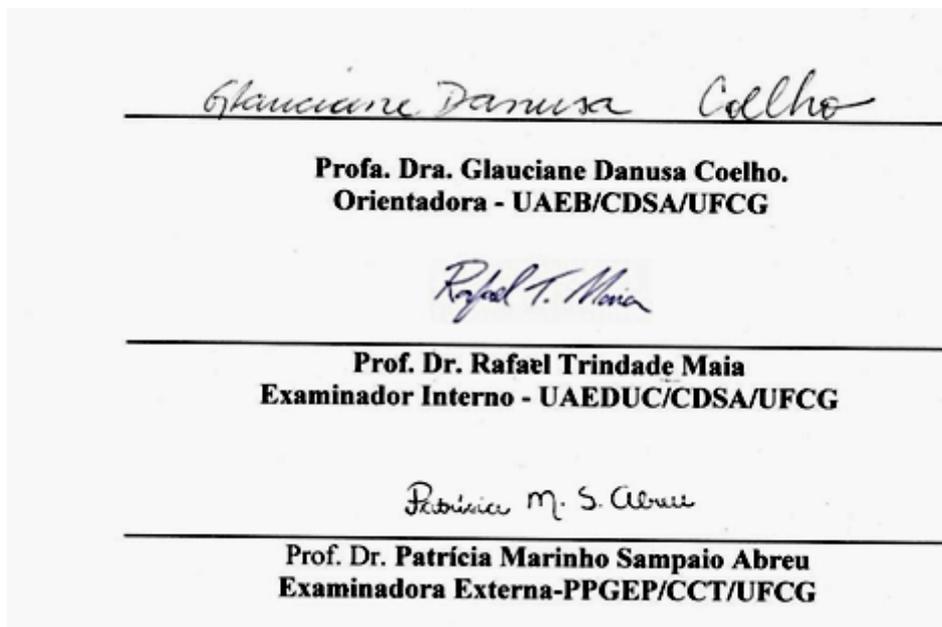
Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

MARIA ALICE DE MELO PINHEIRO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO EXTRATO
BRUTO DE *L. CRINITUS* NA DESCOLORAÇÃO *IN VITRO* DO
CORANTE VERMELHO CONGO**

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 Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Trabalho aprovado em: 15 de dezembro de 2018.

SUMÉ - PB

*Ao autor de minha história “Deus”,
Aos meus pais José Edinaldo e Maria das Graças,
As pessoas que estiveram ao meu lado nesta trajetória.
Dedico*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos concebidas, e por proporcionar a realização deste sonho, dando-me forças em meio a vários obstáculos, me amparando e me guiando todos os dias. “... *Senhor, meu Deus eu te darei graças para sempre.*” Salmos 30:12.

Aos meus pais, José Edinaldo da Silva Pinheiro e Maria das Graças de Melo, por todo amor e cuidado, aos ensinamentos transmitidos, pelas orações, e por tanta doce e singela dedicação a mim. Eu amo vocês.

As minhas irmãs, Aline Rayane e Ana Raquel, pelo companheirismo, apoio, incentivo, carinho, e pelos momentos de risadas compartilhadas.

Ao meu amigo e namorado, Raphael Tássis, pelo amor, carinho e cuidado, por acreditar na minha capacidade, me apoiar e sonhar comigo. Muito obrigada por tudo.

A família Borges: Irapuam Borges, Sueli Gomes, Suellen Tárçyla e Raphael Tássis que sempre me acolheram e tratou-me como filha.

Agradeço a minha amiga Jayane Karine por todos os momentos vivenciados durante esses cinco anos, por dividir comigo momentos de risadas, companheirismo, carinho e ajuda nos momentos que mais precisei. Sou muito grata a Deus pela oportunidade que ele me concedeu em conhecer você.

A Daniele Joyce pela amizade, cumplicidade e convivência harmoniosa vivenciada no apartamento 103. Muito obrigada!

A minha orientadora, Glauciane, exemplo de humildade e inteligência, que sempre me atendeu em meio sua vida agitada e ocupada. Eu agradeço pela paciência, carinho e conselhos. E, principalmente, por acreditar no meu potencial. Meu muito obrigado!

A Professora Adriana Meira Vital, pela contribuição na realização de experimentos no Laboratório de Solos.

A todos aos integrantes do Laboratório de Microbiologia, Kamila Sotero, Caio Azevedo, Patrick Brito, Ewerton Evangelista, Andreza Larissa, George Lacerda, Caroline Freitas, Marco Antônio, e José Carlos. Obrigada por dividirem experiências únicas e contribuírem para o término deste trabalho. Nesse ambiente, não construir somente um grupo de pesquisa, mas sim, uma família.

Ao meu amigo, Marco Antônio, por todo o auxílio e paciência na realização deste trabalho, por compartilhar conhecimento profissional e pessoal. Sou muito grata a você.

A querida Kamila Sotero, pela disponibilidade e desejo em repassar conhecimento nas atividades laboratoriais. Pelo seu exemplo de luta e resistência, mostrando que é possível alcançar o que se almeja.

Ao José Carlos pela sua amizade e disponibilidade no desenvolvimento dos experimentos. Por sua disposição em aprender, e compartilhar conhecimentos entre as Engenharias do CDSA, ampliando assim, o meu olhar profissional.

A Maria Eduarda pela convivência compartilhada no quarto 06 (Residência Universitária), obrigada pela paciência e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

A Andreza Larissa pela amizade, carinho e ajuda nos momentos difíceis.

A Dayse Freitas pelas contribuições durante esta trajetória.

Aos amigos da residência universitária pelos momentos de risadas e descontração em especial a Marco Antônio, Lucas Wagner, José Carlos, João Paulo, Patrick Brito e Willian do Ó.

Ao professor Rafael Trindade e a pesquisadora Patrícia Marinho por participarem de minha banca examinadora e contribuir com este momento tão especial.

A universidade Federal de Campina Grande por ter possibilitado um dos maiores bens, o conhecimento. *“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois, o amanhã pertence as pessoas que se preparam hoje.”* Malcom X.

Por fim, sinto-me feliz e agradecida, por tudo que vivi durante esses cinco anos, foram muitas lutas, mas aprendi a ser forte e lutar por tudo que almejo. Pois como já dizia a canção do Rosa de Saron *“se o fim é bom, também são os meios”* e sem eles tudo isso não seria possível.

Obrigada a todos!!

RESUMO

O descarte inadequado de substâncias tóxicas, como é o caso dos corantes, é um problema ambiental que tem motivado o desenvolvimento de tecnologias capazes de minimizar ou eliminar a toxicidade dessas substâncias, para que sejam descartadas no meio ambiente sem causar danos aos ecossistemas e à saúde humana. O uso de microrganismos e/ou enzimas de origem microbiana tem despertado interesse para a remoção desses corantes dos efluentes têxteis. Dentre os microrganismos utilizados na biorremediação, os basidiomicetos destacam-se por produzir um mecanismo ligninolítico capaz de degradar compostos xenobióticos recalcitrantes. Uma importante enzima do complexo ligninolítico produzida por esses fungos é a lacase, que devido ao alto potencial de degradação de moléculas poluentes tem sido chamada de enzima “ecofriendly”. Neste trabalho, estudou-se o potencial do fungo *L. crinitus* em produzir um complexo enzimático, contendo a enzima lacase, em fermentação em estado sólido (FES) utilizando a vagem de amendoim como substrato. Avaliou-se o efeito de diferentes níveis de umidade (b.u.) e da adição de óleo de soja sobre a produção da lacase utilizando um planejamento fatorial 2². A cinética de produção da lacase foi avaliada a 28°C, durante 30 dias, com a umidade do substrato ajustada para 70% (b.u.) e com adição de 2% de óleo de soja (m:v). O extrato enzimático bruto obtido no pico de produção foi caracterizado e utilizado para descoloração *in vitro* do corante Vermelho Congo. Na descoloração do corante, avaliou-se o efeito de concentrações crescentes do corante e da presença de CuSO₄, em um planejamento fatorial 2², após 24h de incubação. O pico de produção de lacase foi observado aos 6 dias de incubação. A lacase presente no extrato bruto de *L. crinitus* apresentou temperatura e pH ótimos de 50°C e 3,0, respectivamente. A enzima mostrou-se estável em todas as temperaturas avaliadas. A descoloração do corante Vermelho Congo foi influenciada pela adição de CuSO₄. Esses resultados demonstram o potencial do extrato bruto de *L. crinitus* de degradar o corante azoico estudado.

Palavras-chave: Lacase. Enzimas ligninolíticas. Biorremediação. Degradação de corantes.

ABSTRACT

Inadequate disposal of toxic substances, such as dyes, is an environmental problem that aims to develop technologies capable of eliminating or reducing the toxicity of substances that can be disposed of in the environment without ecosystems and human health. The use of microorganisms and / or enzymes of microbial origin has aroused interest for the removal of these dyes from the textile effluents. Among the microorganisms used in the degradation of recalcitrant xenobiotic compounds. An important enzyme of the ligninolytic complex produced by fungi is an enzyme that, unlike the potential for degradation of pollutant molecules, has been called the "ecofriendly" enzyme. (FES) using the enzyme laccase in fermentation in sustainable state (FES) using peanut the substrate. Quality-the-oil-oleo-oil-oleo-oil-oleo-calfry-oil-ui-cals (22), with 30 days, with 30 days, with 30 days adjusted substrate index to 70% (bu) and with addition of 2% soybean oil (m: v). The crude enzymatic extract gained the peak of production and was used for in vitro discoloration of Congo Red dye. In the discoloration of the dye, the effect of increasing the presence of CuSO₄ was evaluated in a factorial design 2², after 24h of incubation. Peak laccase production was observed at 6 days of incubation. The laccase does not present crude extract of *L. crinitus* temperature and pH optimum of 50 ° C and 3,0, respectively. The enzyme was present in all the samples evaluated. The discoloration of Congo Red dye was influenced by the addition of CuSO₄. Results demonstrating the potential crude extract of *L. crinitus* to degrade the studied azo dye.

Key words: Laccase. Ligninolytic enzymes. Bioremediation. Dye degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do corante Vermelho Congo.....	20
Figura 2- Estrutura tridimensional da lacase de <i>Lentinus sp</i> com o grupo cobre.....	27
Figura 3 - <i>Lentinus crinitus</i> cultivado e frutificado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja - C/N180.....	32
Gráfico 1 - Superfície de resposta do planejamento 2^2 para avaliar o efeito do ajuste da umidade e da adição de óleo de soja ao substrato sobre a produção de lacase.....	39
Gráfico 2 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes (umidade e óleo de soja) sobre a variável dependente (produção de lacase).....	40
Gráfico 3 - Perfil da cinética de produção de lacase. Atividade de lacase tendo o ABTS como substrato; Determinação de proteínas pelo método de Biureto usando soro albumina bovina como padrão. Os testes foram realizados em triplicata.....	42
Gráfico 4- Efeito do pH sobre a atividade da lacase de <i>L. crinitus</i> durante seis dias de fermentação utilizando o amendoim como substrato. Utilizou-se tampão McIlvaine da faixa de 2,2 a 6,6. As barras indicam desvio padrão de duplicata.....	43
Gráfico 5 - Efeito da temperatura sobre a atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> determinada no pH ótimo. Os ensaios foram realizados em duplicata.....	43
Gráfico 6 - Perfil de estabilidade da lacase de <i>L. crinitus</i> frente a variação do pH 3,0 (—●—) e pH 4,0 (—▼—). Os testes tiveram ABTS como substrato. As barras indicam desvio padrão entre duplicatas.....	44
Gráfico 7 - Estabilidade da atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> na faixa de temperatura de 30°C (—X—), 40 °C (—●—), 50 °C (—▲—), 60 °C(—▼—). A incubação foi realizada em banho-maria no pH ótimo (3,0). Os testes tiveram ABTS como substrato. As barras indicam desvio padrão entre duplicatas.....	45
Gráfico 8 - Gráfico de contorno do planejamento 2^2 para a avaliação do efeito das diferentes concentrações de VC e CuSO ₄ sobre a descoloração do corante.....	46
Gráfico 9 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes (concentrações de corante VC e CuSO ₄) sobre a variável dependente (descoloração). A faixa vermelha indica o efeito significativo no nível de confiança de 95%.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio MEA.....	33
Tabela 2 – Níveis do planejamento experimental para a determinação do efeito da umidade e da adição do óleo de soja.....	34
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental	34
Tabela 4 - Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática. ..	35
Tabela 5 - Níveis do planejamento experimental na avaliação do potencial do extrato bruto de <i>L. crinitus</i> de degradar <i>in vitro</i> do corante Vermelho Congo.....	37
Tabela 6 - Níveis do planejamento experimental usado para estudar a degradação <i>in vitro</i> do corante Vermelho Congo.	37
Tabela 7 - Composição do meio reacional para determinação da descoloração <i>in vitro</i> do corante vermelho Congo.	38
Tabela 8 - Informações de agrupamento usando o método de Tukey com confiança de 95% para avaliação da melhor condição de produção da lacase. Letras diferentes indicam diferença estatística. Os ensaios foram realizados em triplicatas.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

CCIBt- Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungosdo Instituto de Botânica

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CuSO₄- Sulfato de cobre

FES - Fermentação em Estado Sólido

F_{Sm}-Fermentação submersa

LMES- Enzimas Modificadoras de Lignina

MEA- Ágar Extrato de Malte

pH - Potencial Hidrogeniônico

PNRS- Política Nacional de Resíduos Sólidos procura solucionar

VC - Vermelho Congo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 INDÚSTRIA TÊXTIL	15
3.2 <i>CORANTES TÊXTEIS</i>	16
3.2.1 Classificação dos corantes	17
3.3 VERMELHO CONGO.....	19
3.3.1 Classificação do Vermelho Congo	20
3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES.....	21
3.5 BIORREMEDIAÇÃO	22
3.5 FUNGOS BASIDIOMICETOS	23
3.6 <i>LENTINUS CRINITUS</i>	24
3.7 ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO.....	25
3.8 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	28
3.8.1 Amendoim (<i>ArachishypogaeaL.</i>)	28
3.10 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	32
4.2 INÓCULO	32
4.3 PREPARO DO SUBSTRATO	33
4.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO AJUSTE DA UMIDADE E DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE LACASE	33
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.....	35
4.6 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	35
4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA LACASE DE <i>L. crinitus</i>	35
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	35
4.9 DETERMINAÇÃO DO pH.....	36
4.10 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE PRODUZIDA POR <i>L. CRINITUS</i> EM VAGEM DE AMENDOIM.....	36
4.10.1 Determinação da temperatura o do pH ótimos de reação:	36
4.10.2 Determinação da estabilidade ao pH:	36

4.10.3 Determinação da estabilidade térmica:	37
4.11 DESCOLORAÇÃO IN VITRO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO POR <i>L. crinitus</i> DURANTE FES EM VAGEM DE AMENDOIM.....	37
5 RESULTADOS	39
5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>L. crinitus</i> EM FES UTILIZANDO VAGEM DE AMENDOIM PARA A PRODUÇÃO DE LACASE	39
5.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO	41
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LACASE BRUTA PRODUZIDA POR <i>L. crinitus</i> EM FES TENDO VAGEM DE AMENDOIM COMO SUBSTRATO	42
5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO DE <i>L. crinitus</i>	45
7 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Uma das consequências do crescimento das atividades agroindustriais no Brasil e no mundo é a geração de grandes quantidades de resíduos sólidos, havendo, portanto, a necessidade de desenvolvimento de tecnologias que utilizem tais resíduos para a geração de produtos. A utilização de resíduos agroindustriais para a geração de bioprodutos tem sido foco de estudo de pesquisadores do mundo todo. Um resíduo agroindustrial produzido em grande quantidade no Brasil e no mundo é a vagem de amendoim. Visto que esse resíduo é um composto lignocelulósico, torna-se interessante para aplicação de produção de enzimas por microrganismos, como os fungos basidiomicetos. Esses fungos são conhecidos como causadores da podridão branca na madeira devido a capacidade de produzir enzimas que degradam a celulose, a hemicelulose e a lignina. A lacase é uma enzima capaz de degradar e mineralizar a lignina, bem como compostos xenobióticos recalcitrantes, como é o caso dos corantes sintéticos.

A indústria da moda, intensa usuária de corantes sintéticos, é responsável por grande parte da poluição dos recursos hídricos, devido ao descarte inadequado de efluentes coloridos, que são fontes de poluição visual e de alterações nos ciclos biológicos, o que pode causar problemas de saúde aos seres humanos e ao meio ambiente. Assim, o tratamento prévio de efluentes têxteis antes que seja feito o descarte nos recursos hídricos é essencial para melhoria das condições da vida no planeta. Diferentes tipos de tratamento podem ser aplicados nos efluentes provenientes das indústrias têxteis, com destaque para a biorremediação que usa seres vivos, como microrganismos, ou enzimas de origem microbiana. Considerando que as lacases são enzimas “ecofriendly”, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do fungo basidiomiceto causador da podridão branca *Lentinus crinitus*, em produzir um complexo enzimático, contendo a enzima lacase, no processo de FES utilizando a vagem de amendoim como substrato, e estudar o uso desse complexo enzimático na degradação do corante azoico, vermelho Congo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 em produzira enzima lacase em fermentação em estado sólido (FES) utilizando vagem de amendoim com aplicação na degradação de corante têxtil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial da vagem de amendoim como substrato para a produção de lacase em FES;
- Determinar o efeito da umidade da vagem de amendoim e da adição de óleo de soja na produção de lacases por *L. crinitus*;
- Realizar a cinética de produção de lacase, de proteínas totais e do pH do extrato bruto de *L. crinitus*;
- Caracterizar o extrato enzimático, quanto ao pH e à temperatura ótima, assim como a estabilidade dessa enzima frente a variações desses parâmetros;
- Avaliar o potencial do extrato bruto de *L. crinitus* na degradação do corante Vermelho Congo *in vitro*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 INDÚSTRIA TÊXTIL

O surgimento de vestimentas remete às primeiras civilizações, com registros iniciais no período Paleolítico, em que a necessidade de sobrevivência humana, fez com que o ser humano fizesse uso de pele de animais para proteção, e de certo modo, para atender ao anseio pela satisfação estética. Os primeiros materiais têxteis eram de procedência vegetal, como o linho e o algodão, e animal como a lã (extraída da tosquia de ovelhas) e a seda. De forma empírica, as gerações aprimoravam técnicas que agregava valor ao tecido, como acabamentos de borda e tingimento. As fibras naturais, matéria primordial na geração de produtos têxteis, mostram-se de grande relevância desde o surgimento da primeira veste tecida. Atualmente, são utilizadas fibras artificiais e sintéticas, e vê-se o surgimento dos tecidos inteligentes para atender a demanda de consumo (ARAGÃO et al., 2002).

A produção têxtil é representada por cinco etapas. A primeira é a afiação, cuja função é gerar fios por meio de fibras naturais ou manufaturadas. O produto obtido pode ser destinado para o beneficiamento (envolve os processos de tingimento, engomagem, retorção e tratamento especiais) ou seguir para as próximas etapas, tecelagens e malharias (BASTIAN, 2009). A etapa final é o enobrecimento que promove a preparação e acabamento dos tecidos, e a confecção, etapa de incorporação de peças (NIEBISCH et al., 2014).

No processo de transformação da fibra em fios, seguido a formação dos tecidos e posteriormente a produção da roupa, são utilizados recursos naturais, materiais sintéticos e corantes que promovem a formação de resíduos que precisam ser tratados antes do descarte (CHEQUE et al., 2013).

As etapas de montagem, fixação e tratamento, são consideradas importantes, e fazem parte do processo de tingimento. A fixação do corante à fibra ocorre por meio de reações químicas em diferentes etapas da montagem e fixação. No final do processo é necessário realizar a lavagem em banhos correntes para retirar o excesso do corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas iniciais (GUARATINI; ZANONI, 2000).

No cenário mundial o mercado têxtil e de confecção é um dos mais dinâmicos, com o lançamento constante de novos produtos. Em 2010 a produção mundial de fios, tecidos, malhas e confeccionados chegou a 84 milhões de toneladas. E em 2013 foram consumidos

89,1 milhões de toneladas de fibras, deste quantitativo, 70% foram fibras químicas e 30% de fibras naturais, como o algodão (ABIT, 2018).

O setor têxtil brasileiro ocupa grande espaço na economia, sendo o setor que mais emprega da indústria de transformação, consolidando-se como quinto maior produtor mundial têxtil (ABIT, 2013), entretanto, esse mesmo setor é responsável por considerável impacto nos ecossistemas. Segundo Dellamatrice (2005) e Khouni et al.(2011), a indústria têxtil colabora com a poluição ambiental devido aos efluentes gerados durante o processo de produção, que apresentam baixa degradação, como os corantes que participam da etapa do tingimento do tecido.

3.2 CORANTES TÊXTEIS

O uso de corantes em tecidos é evidenciado desde as primeiras civilizações, com amostras de tecido do Egito Antigo - por volta de 2500 a.C. Os corantes naturais foram fortemente utilizados até a metade do século XXI, sendo que os métodos de extração e aplicação eram secretamente guardados. A necessidade de corantes para suprir a crescente demanda da indústria impulsionou a produção de corantes sintéticos. O primeiro corante sintético, malva, foi descoberto pelo químico inglês William H. Perkin (1860-1929), em 1856. Esse corante deriva do coque, e a sua descoberta possibilitou a produção dos corantes sintéticos em grande escala (ZANONI ; CARNEIRO, 2001).

De modo geral, os corantes têxteis são moléculas orgânicas que atuam na mudança da coloração de fibras e são aplicados durante o processo de tingimento, podendo se fixar ou não ao substrato devido às diferentes propriedades apresentadas. Os corantes são classificados de acordo com a estrutura química ou pelo método de fixação (CARMEN; DANIELA, 2012; CHEQUE et al.,2013). Moraes e colaboradores (2000) ressaltam ainda que os corantes podem ser classificados a partir do grupo cromóforo e também pela estrutura responsável por fixar o corante à fibra.

A molécula dos corantes possui três partes funcionais para a determinação da coloração: o cromóforo, principal responsável pela determinação da cor de uma substância, o auxocromo, que intensifica a ação do cromóforo na síntese de corantes, sendo caracterizados por serem substituintes doadores ou aceptores de elétrons; e o cromógeno, a própria estrutura

colorante, geralmente caracterizada por anéis aromáticos, em que o cromógeno e o cromóforo estarão presentes (PINAZO BELTRAN, 2015; MARTÍNEZ SUÁREZ, 2017).

3.2.1 Classificação dos corantes

Os corantes são classificados em (GUARANTINI e ZANONI, 2000; CARMEN; DANIELA, 2012):

Corantes reativos: apresentam um grupo eletrofílico (reativo) com capacidade de formar com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas, ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, e também com grupos amino das poliamidas. Dos vários tipos de corantes reativos, alguns se destacam por apresentar a função azo e antraquinona representadas pelos grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. O processo de reação química desse grupo de corantes ocorre mediante a transferência do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose. Entre as características importantes destacam-se a alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra.

Corantes Diretos: Estes corantes configuram-se como compostos solúveis em água, que promovem o tingimento por meio de interações de Van der Waals estabelecidas com as fibras de celulose. Os corantes diretos são constituídos principalmente por mais de um grupo azo (díazo, triazo e etc.) que podem ser pré-transformados em complexos metálicos. Na presença de eletrólitos, esses corantes aumentam a afinidade pela planaridade na configuração da molécula ou na dupla ligação conjugada, que é responsável pelo aumento de adsorção do corante sobre a fibra. Apresentam como grande vantagem o alto grau de exaustão durante sua aplicabilidade, e como consequência a diminuição da concentração em águas residuárias.

Corantes Azóicos: São corantes insolúveis em água produzidos diretamente na fibra no processo de tingimento do tecido. Durante este processo, a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, denominado de agente de acoplamento (naftol) que possui afinidade por celulose. Por meio da adição de um sal de diazônio (RN^2+) o corante torna-se insolúvel, isso decorre da capacidade do sal de promover uma reação em que o agente de acoplamento é fixado na fibra. Esse processo de aplicação do corante diretamente na fibra,

mediante a combinação de um corante precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, possibilita uma elevada fixação e resistência contra a luz e umidade.

Corantes a Cuba: São caracterizados como uma grande e importante classe de corante baseada nos índigos, tiodigóides e antraquinóides. São praticamente insolúveis em água, porém no decorrer do processo de tintura são reduzidos com ditonito em solução alcalina, tornando-se compostos solúveis. Destaca-se o uso desses corantes na tintura de algodão, porém podem ser utilizados em outros materiais, visto que apresentam elevadas propriedades de fixação. A desvantagem do uso deste corante é a produção química de hidrossulfito de sódio que pode ocasionar problemas ecológicos, tornando o custo desse corante bastante elevado.

Corantes de Enxofre: Estes corantes caracterizam-se por serem compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (Sn-) altamente insolúveis em água após a sua aplicação. Inicialmente são aplicados após pré-redução em banho de ditonito de sódio proporcionando a forma solúvel, posteriormente são reoxidados sobre a fibra pelo contato com o ar. A sua maior aplicabilidade é na tintura de fibras celulósicas, conferindo cores: preto, verde oliva, azul marinho, marrom, apresentando boa fixação. Entretanto, apresentam resíduos altamente tóxicos.

Corantes Dispersivos: É uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e fibras hidrofóbicas por meio de suspensão. No processo de tintura, os corantes dispersivos sofrem hidrólise, e ocorre uma precipitação da molécula original. O grau de solubilidade do corante é pequeno, influenciando o processamento e a qualidade da tintura. Frequentemente, o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes que apresentam cadeias longas e estabilizam a suspensão dos corantes promovendo o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. Esses corantes têm sido utilizados na tintura de fibras sintéticas como acetato celulose, nylon, polyester e poliacrilonitrila.

Corantes Pré-Metalizados: São usados na tintura de fibras protéicas e poliamida. Esses corantes são caracterizados pelo o grupo hidroxila e carboxila na posição ortho em relação ao cromóforo azo proporcionando a formação de íons metálicos o que provoca uma desvantagem ecológica visto que esses corantes apresentam alto conteúdo de metal nas águas residuárias.

Corantes Branqueadores: São corantes com a capacidade de reduzir a aparência amarelada das fibras têxteis no estado bruto, por absorver luz em baixo comprimento de onda. A diminuição da tonalidade é reduzida pela oxidação da fibra com alvejantes ou branqueadores. Esses corantes têm como característica a presença dos grupos carboxílicos azometino ($-N=CH-$) ou etilênicos ($-CH=CH-$) agrupados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que quando expostos a luz ultra-violeta proporciona reflexão por fluorescência na região de 430 a 440 nm.

3.3 VERMELHO CONGO

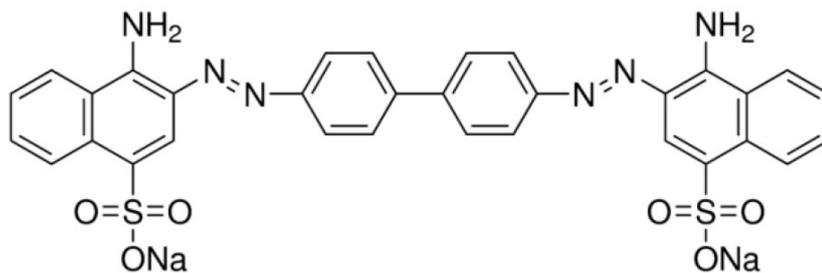
O corante Vermelho Congo (VC) foi criado pelo químico Paul Böttiger, em 1883, sendo o primeiro dos chamados corantes direto, que não exigia um mordente para manchar as fibras têxteis (VERG, 1988). Após descoberta, Böttiger pediu a patente do novo corante vermelho em seu próprio nome em 1884, e posteriormente, concedeu a patente para a empresa AGFA –Actien Gesellschaft für Anilin farbenfabrikation, uma fábrica de corantes de Berlim, que começou a comercializar a marca VC (BÖTTIGER, 1884). A AGFA obteve muito lucro a partir da comercialização do corante, consolidando-se no mercado têxtil. Em 1910, havia muitos corantes têxteis com o nome do Congo: Congo rubine, Congo corinth, Congo brilhante, laranja Congo, Congo Brown e Congo Blue (HUMMEL, 1910). O corante VC é pouco utilizado nos processos têxteis, devido sua facilidade de mudar de cor quando tocado pela pele suada (VOISTLÄNDER, 1983) e pela tendência em manchar outras peças de roupas quando colocadas em contato.

O primeiro uso científico do VC foi para determinação da produção de ácidos no trato intestinalde animais (SCHULZ, 1886). A partir da tendência do corante mudar de cor de acordo com o pH, este foi utilizado como indicador de pH em processos industriais (GRIESBACH, 1886). Em 1922, descobriu-se que o VC possui a capacidade de ligar-se à proteína amilóide, permitindo o uso no diagnóstico da amiloidose (BENNHOLD, 1923). Na área de neuropatologia, o VC contribuiu para o melhoramento da especificidade da coloração histológica pela observação de característica de birrefringência verde da substância amilóide quando em contato com o corante VC e vista sob luz polarizada (DIVRY, 1927).

3.3.1 Classificação do Vermelho Congo

O corante VC é um sal sódico do ácido benzidinodiazobis 1-naftilamina-4-sulfônico, com fórmula molecular $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, massa molar de $696,66\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e ponto de fusão acima de 360°C . A estrutura molecular (figura 1) é muito complexa, contando com anéis aromáticos que tornam difícil o processo de degradação. Trata-se de um corante que apresenta dois grupos de ligações estáveis azo ($-\text{N}=\text{N}-$) e, portanto, é classificado como diazo secundário (AXELSON; GIORGADZE; YOUNGBERG, 2008; QUEIROZ et al., 2011; NCBI, 2016).

Figura 1- Estrutura química do corante Vermelho Congo



Fonte: National Center for Biotechnology Information (PubChem).

O VC é solúvel em água, produzindo uma solução coloidal vermelha, com melhor solubilidade em solventes orgânicos como o etanol. Ele possui elevada afinidade com fibras de celulose, aparentemente com ligações não-covalentes (AXELSON; GIORGADZE; YOUNGBERG, 2008; REIS, 2009; JALIFE-JACOBO et al., 2016). Entretanto, autores como Sponza e Isik (2005) relatam que a clivagem dos grupos azóicos deste corante podem formar aminas cancerígenas como a benzidina, substância tóxica para animais aquáticos e plantas que pode se acumular nos sedimentos das estações de tratamento de efluentes. Diante disso, o uso do VC vem sendo reduzido pela indústria de celulose (algodão têxtil e papel) (AGHIZIONINBAKANI; NIRMALA; SIVA, 2015).

Devido a toxicidade do corante VC, recentemente vários estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de degradar esse corante por métodos químicos, como a oxidação eletroquímica (JALIFE-JACOBO et al., 2016), a oxidação por fotocatalise (BRADHA et al., 2015) ou por processos biológicos (RODRIGUES et al., 2011; MELO et al.,

2014; SILVA, 2015; SOARES 2016, SCHMIDT; SPEROTTO; GRANADA, 2016; SOTERO et al., 2017).

3.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES

O descarte inadequado de efluentes coloridos tem gerado sérios problemas ao ambiente, visto que os produtos liberados durante a degradação são tóxicos causando mutações e câncer (WANYONYI; ONYARI; SHIUNDU, 2014). Além disso, esses efluentes causam turbidez na água, consumo de oxigênio, eutrofização dos mananciais e odores fortes no estabelecimento da água (REIS, 2009). Desta forma, a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 de março de 2005, estabelece que todos os efluentes de fontes poluidoras só poderão ser descartados, direta ou indiretamente, nos corpos de água após o tratamento. A persistência dos corantes nos efluentes industriais é um dos desafios para realizar o tratamento adequado, já que possuem elevada diversidade de compostos e grande complexidade (CAMPOS, 2010).

Nesse sentido, vários métodos de tratamentos são usados a fim de remediar essa problemática, dentre os quais, tratamentos: 1. físicos, que englobam processos de sedimentação, decantação, filtração, centrifugação, filtração por membranas e mudança de fases por extração de solventes ou adsorção (REIS, 2009); e 2. químicos, como os processos oxidativos avançados que quebram as moléculas recalcitrantes (CAMPOS, 2010; CARMEN; DANIELA, 2012) e a ozonização que promove a descoloração do efluente e aumento de biodegradabilidade (ALMEIDA et al., 2004).

Devido à preocupação com a formação de subprodutos indesejados, os tratamentos biológicos estão ganhando força nas pesquisas e aplicações industriais, sendo considerados como alternativa para remoção dos corantes dos efluentes que são gerados no processo de tingimento (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016). O tratamento biológico possui eficiência e capacidade de remediar elevadas quantidades de efluentes, por meio da atuação dos microrganismos nos sistemas que conseguem converter substratos oriundos de resíduos agroindustriais como fonte nutritiva, promovendo um baixo custo de tratamento, alta eficiência e a geração de menos poluição secundária (TAN et al., 2016). Desta forma, várias classes de corantes poluentes podem ser remediados (PEREIRA; FREIRE 2005).

De acordo com Bechtold et al., (2006) o processo de descoloração ou degradação de efluentes têxteis por tratamento biológico pode ser aeróbio ou anaeróbio, ou pode envolver a associação de ambos, dependendo do microorganismo selecionado. Dentre estes microrganismos, os fungos, bactérias e algas vêm sendo estudados com o intuito de avaliar a capacidade na descoloração e na degradação de corantes têxteis, ressaltando a especificidade de cada microrganismo, visto que, possuem características diferentes apresentando vantagens e desvantagens no processo. (CHEQUER et al., 2013).

3.5 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é o tratamento biológico que utiliza microrganismos e / ou plantas com a capacidade de degradar compostos recalcitrantes do ambiente. Esse processo também pode ser realizado por produtos biotecnológicos como enzimas que degradam substâncias tóxicas convertendo-as em substâncias menos ou não tóxicas (JACQUES et al., 2007; SOARES et al., 2011; MUTECA, 2012; GOMEZ; SARTAJ, 2014; LORENZO, 2018). A biorremediação tem se mostrado bastante promissora por promover baixa perturbação ambiental e economia, associada a uma ampla aplicabilidade, sendo que a otimização do processo depende do contaminante a ser tratado, bem como das condições ambientais (CARNEIRO; GARIGLIO, 2010).

A biorremediação pode ocorrer no local do ambiente de origem da geração do poluente (*in situ*), nesse caso a remoção do material não é necessária reduzindo os custos e problemas relacionados ao transporte. Quando o poluente a ser tratado é transportado do local de origem, o tratamento é denominado *ex situ* (LORENZO, 2018). Essa tecnologia pode ser utilizada em vários contextos, como por exemplo, na remoção de toxinas dos poços subterrâneos, em solos contaminados, no derrames químicos e de óleos (CARBUCCI, 2007), em áreas de resíduos tóxicos, na degradação de herbicidas, na decomposição de substâncias orgânicas e inorgânicas, no desentupimento de bueiros, entre outros (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A eficácia do processo de biorremediação depende de alguns parâmetros de controle no processo, como: a temperatura, a concentração de oxigênio, o teor de umidade e o pH (BANERJI et al., 1995; PROVIDENTI et al., 1993; MUTECA, 2012).

Vários microrganismos como bactérias e fungos são responsáveis por reduzir poluentes do ambiente. Apesar de muitos desses microrganismos terem necessidades nutricionais semelhantes ao ser humano, eles podem metabolizar substâncias como petróleo, enxofre, gás nitrogênio, xenobióticos, bifenilaspolicloradas (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

No tratamento biológico, as bactérias têm uso limitado por alguns fatores de estresse ambiental. Sendo assim, apresentam baixa eficiência na degradação de compostos ligados ao solo ou insolúveis em água (BALLAMINUT, 2007). Em relação ao tratamento de efluentes têxteis, a aplicação de bactérias na descoloração de corantes azo é evidenciada por TAN e colaboradores (2016). Os autores afirmam que esse tratamento torna-se um pouco limitado devido aos subprodutos da descoloração das soluções que são recalcitrantes ao ataque de bactérias.

Por outro lado, os fungos vêm mostrando eficácia na degradação de compostos xenobióticos e de compostos orgânicos de difícil degradação, além de apresentarem características que favorecem a sobrevivência e crescimento em meios com concentrações elevadas de contaminantes com a capacidade de metabolizá-los como fonte de energia (EGGEN; MAJCHERCZYK, 1998). Os fungos mais utilizados em biorremediação são os filamentosos que possuem capacidade de adaptação metabólica a diferentes fontes de carbono e nitrogênio (SOLÍS et al., 2012). Os fungos basidiomicetos vêm ganhando destaque na detoxificação de moléculas xenobióticas tóxicas, como corantes sintéticos (BALLAMINUT, 2007) e pentaclorofenol (COELHO, 2007), hexaclorobenzeno (MOREIRA NETO, 2006), por reduzirem a toxicidade da molécula degradada.

3.5 FUNGOS BASIDIOMICETOS

Os fungos basidiomicetos são conhecidos por produzirem corpos de frutificação como cogumelos e orelha-de-pau. A fase vegetativa é denominada micélio, que é formado por vários filamentos septados chamados de hifas. Esses fungos apresentam estruturas reprodutivas denominadas de basídios, que funcionam como esporângios de reprodução sexuada (GUGLIOTTA; CAPELARI 1998; SILVA; COELHO, 2006; VASCONCELLOS NETO, 2010).

Esses fungos podem ser divididos em fungos de podridão branca, podridão parda e podridão mole. A classificação é realizada conforme as diferenças de padrões de degradação da madeira, sendo levado em consideração características macroscópicas da degradação e os grupos de enzimas excretados. Os fungos de podridão branca degradam os três principais constituintes da madeira que são a celulose, a hemicelulose e a lignina. Enquanto os fungos de podridão parda degradam polissacarídeos tais como celulose e hemicelulose (SOARES, 1998; SILVA; COELHO, 2006; STRONG; KLAUS 2011).

Os fungos de podridão branca apresentam potencial na degradação de lignina tornando-os um grupo interessante para o uso em tratamentos de biorremediação, pois se entende que o sistema enzimático inespecífico responsável pela degradação da lignina (SILVA; COELHO, 2006; MENEZES; BARRETO, 2015) atua também na degradação de compostos poluentes oriundos de matéria orgânica como clorofenóis (MATHEUS; OKINO, 1998; BALLAMINUT, 2007;), corantes azo e antraquinônicos, herbicidas, agrotóxicos (MACHADO et al., 2005; MACHADO et al 2006 a; LEE et al., 2014).

A capacidade dos fungos basidiomicetos em degradar componentes ligninolíticos ocorre por meio da secreção de enzimas ligninolíticas que convertem polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como fonte nutritiva (TUOMELA et al., 2000; LEE et al., 2014).

3.6 *LENTINUS CRINITUS*

O fungo *Lentinus crinitus* é classificado segundo o *Catalogue of life: Annual Checklist* – 2018, em Filo Basidiomycota; Classe Basidiomicetos; Ordem Poliporales; Família Poliporaceae e gênero *Lentinus*. Entre as características morfológicas, Guerrero e Homrich (1999) relatam que esses fungos apresentam píleo ou chapéu com 2-5 cm de diâmetro, frutificações castanhas, deprimidos no centro e superfícies com feixes de pêlos de 1 cm de comprimento. Esse basidiomiceto é encontrado em madeira em decomposição, sendo classificado como um fungo de podridão branca, que tem distribuição pantropical (na África, na Ásia e nas Américas). No Brasil, foi relatada ocorrência dessa espécie em diferentes Estados como Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Amapá, Pará, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Rondônia e São Paulo (SILVA; GIBERTONI, 2006).

O gênero *Lentinus* é composto por fungos comestíveis e possui características que lhe configuram como degradadores de madeira, com a capacidade de produzir enzimas modificadoras de lignina (LMEs) (NIEBISCH, 2013; VALLE et al., 2014), que contribuem em processos biotecnológicos.

O potencial do basidiomiceto *Lentinus crinitus* vem sendo utilizado em processos de biorremediação de poluentes como hexaclorobenzeno (MATHEUS et al., 2000), pentaclorofenol (MACHADO et al., 2006a; BALLAMINUT, 2007) e na descoloração de corantes sintéticos (NIEBISCH, 2009; BALLAMINUT et al., 2014).

3.7 ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO

O cenário global em relação a processos bioquímicos impulsionou a produção industrial menos agressiva ao meio ambiente, e que mantenha a produtividade e lucratividade. Nesse contexto, o mercado mundial de enzima configura-se grande potencial social e econômico quando se tem como foco o desenvolvimento sustentável (SANT'ANNA, 2001; BON et al., 2008). Um grande desafio para esta demanda socio-ambiental, principalmente nas economias emergentes, é a otimização de processos de produção associado ao nível de sofisticação tecnológica na produção enzimática. Entretanto, estima-se um crescimento anual gradativo em economias na América do Sul e Central, na África e Oriente Médio justificando esse percentual na demanda da indústria de ração animal e da indústria de bebidas e alimentos por enzimas para uso no seu processo produtivo (FREEDONIA, 2011).

As enzimas ligninolíticas possuem grande interesse biotecnológico de aplicabilidade industrial, devido à configuração molecular constituída a partir da integração de moléculas de carboidratos e lipídios. O seu potencial depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio, entretanto algumas enzimas necessitam de cofatores ou mediadores, como íons ou compostos orgânicos (BON *et al.*, 2008).

As enzimas lignonilíticas vêm ganhando destaque, não só na degradação da lignina, como também na degradação de outros compostos, como xenobióticos. As principais enzimas desse complexo são MnP (manganês peroxidase), as oxidoredutases, a LiP (lignina peroxidase) e a fenoxidase, conhecida como lacase (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003; LEE et al., 2014).

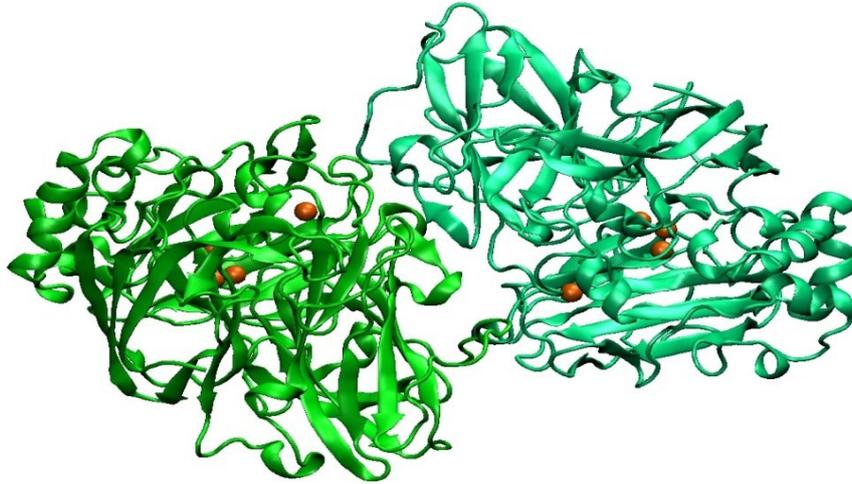
Entre as enzimas desta classificação que mais se destacam são a manganês peroxidases, lignina peroxidases e lacases que podem ser obtidas extracelularmente por fungos filamentosos ou basidiomicetos (NOVOTNÝ et al., 2004). Segundo Silva e Gomes (2004), as lacases e as manganês peroxidases são responsáveis por oxidar estruturas fenólicas presentes na lignina, enzimas fenol-oxidases apresentam pouca especificidade, e podem se associar a substratos inespecíficos, possibilitando microrganismos oxidar compostos com estruturas similares aos derivados da lignina.

3.7.1 *Lacases*

As lacases são encontradas na natureza por meio dos fungos, bactérias e plantas. No entanto, os fungos são os maiores produtores desta enzima lignonilítica, apresentando aplicação com destaque em processos biotecnológicos. (GIARDINA et al., 2010). As lacases fúngicas podem ser encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos, sendo esse o maior produtor de lacase (SOUZA et al., 2003). Lacases são ligninases (EC 1.10.3.2, *p*-difenoil: dioxigênio oxidoreductase) com capacidade em degradar diversos substratos fenolíticos e aromáticos. Nas reações catalíticas essas enzimas realizam a oxidação de substratos ao radical livre correspondente ao passo que reduzem oxigênio à água (STRONG; CLAUS, 2011; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; MARTÍNKOVÁ et al., 2016).

As lacases possuem a capacidade de catalisar a remoção de elétrons e um próton de grupos hidróxi-fenólicos ou amino aromáticos formando seus respectivos radicais livres (LENARTOVICZ et al., 2003). A capacidade catalítica da enzima está associada a quatro átomos de cobre que existem em sua molécula (KUMAR; SING; PETER, 2003; JANUSZ et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2- Estrutura tridimensional da lacase de *Lentinus sp* com o grupo cobre.



Fonte: Dados da Pesquisa

Nos processos enzimáticos, os átomos de cobre formadores da enzima participam da catálise e os elétrons podem adentrar a molécula de várias formas. O mecanismo da reação se inicia quando ocorre uma transferência de elétron para um dos átomos de cobre e então se forma um radical livre a partir de um substrato orgânico. A redução do oxigênio forma duas moléculas de água, uma delas é transportada rapidamente para a solução e a outra permanece ligada fortemente ao íon cobre 2 (YAROPOLOV et al, 1994).

Alguns fungos de podridão branca não são capazes de secretar MnP e LiP, entretanto, são eficientes na biodegradação de compostos xenobióticos na presença de lacases, sendo consideradas a principal enzima degradadora de lignina (HERNÁNDEZ et al., 2016), devido sua baixa especificidade de substrato e sua alta capacidade catalítica dependendo de sua origem (KUBICEK, 2012).

Entre as enzimas que possuem cobre em seu sítio ativo, destaca-se a lacase por sua capacidade de degradar substratos xenobióticos (GIARDINA et al., 2010), apresentando grande potencial na bioconversão de ligninas e seus derivados, e outros compostos orgânicos, desempenhando papel importante em processos de biorremediação (MATE; ALCALDE, 2016), como a descontaminação de efluentes papaleiros e têxteis (PEZZELLA; GUARINO; PISCITELLI, 2015), ainda podendo ser aplicadas na sacarificação da biomassa e na produção de etanol celulósico (LOMASCOLO et al., 2011; SINGVI; DIGAMBAR; GOKHALE, 2014).

Os tratamentos existentes para a remediação de resíduos têxteis não são completamente eficazes. Diante disso, as enzimas têm sido amplamente aplicadas em

processos de recuperação de efluentes. As lacases, além de apresentarem potencial para a remoção de corantes dos efluentes, têm sido utilizadas no processamento de clarificação de materiais têxteis, representam uma alternativa ambientalmente mais adequada para o tratamento de resíduos têxteis. (COUTO; HERRERA, 2006; NIEBISCH et al., 2010).

3.8 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As matérias-primas lignocelulósicas são apontadas como fontes renováveis que ocorrem em abundância na natureza, sendo compreendidas pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Os resíduos agroindustriais têm se destacado diante das características intrínsecas obtidas após o processamento da matéria-prima. Vale ressaltar que o Brasil conta com alta disponibilidade de matéria prima lignocelulósica (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Frequentemente, por não haver aplicabilidade direta, os resíduos agroindustriais gerados apresentam pouco ou nenhum valor econômico. Esses resíduos são compostos por palha, o caule, folhas, casca, semente e polpa de legumes e cereais (arroz, trigo, milho, sorgo, batata e cevada). Entretanto, esses materiais apresentam substâncias (açúcares, fibras, proteínas e minerais) que podem ser usadas como fontes alternativas de carboidratos e nitrogênio, na substituição dos substratos sintéticos aplicados em bioprocessos (PANESAR et al., 2016). Isso porque os microrganismos possuem a capacidade de converter esses substratos em produtos de interesse industrial (PANDA et al., 2016).

Santos e colaboradores (2018) destacam que a utilização dos resíduos agroindustriais, além de reduzir os custos de produção e manter o rendimento equivalente das fontes sintéticas, colabora na redução de materiais no ambiente. Sendo um dos problemas ambientais da atualidade, que a Política Nacional de Resíduos Sólidos procura solucionar (PNRS) (BRASIL 2010). Nesse sentido, vários estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar o potencial desses resíduos como substratos para uso em processos de fermentação em estado sólido, visando à aplicabilidade em grande escala.

3.8.1 Amendoim (*Arachishypogaea*L.)

O amendoim (*Arachishypogaea* L.) é uma planta poliplóide constituída pela combinação de dois conjuntos completos de cromossomos (genomas) de duas espécies

distintas, a *Arachisipaënsis* e *Arachisduranensis*. Desta forma, o amendoim é classificado como alopóliploide. Por ser uma oleaginosa têm se destacado mundialmente por produzir um percentual maior que 4% da produção mundial de óleos vegetais, tornando o quinto mais consumido no mundo, com uma produção superior a 5 milhões de toneladas métrica em 2012 (EMPRAPA, 2014).

No cenário brasileiro, o mercado do amendoim é constituído por dois tipos botânicos: o Valência com hábito de crescimento ereto com sementes pequenas de coloração vermelha, e o Virgínia de porte rasteiro com sementes grandes, possuindo coloração bege (SANTOS et al., 1997; DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013). Essas cultivares colaboram com os índices da produção brasileira.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017), a produção da safra de 2016/2017 foi de 456,7 mil toneladas, com destaque para a região sudeste. Entretanto, na região nordeste, a agricultura familiar representa um modelo agrícola expressivo, e o manejo de amendoim torna-se uma alternativa atraente para o desenvolvimento de novos produtos derivados do óleo vegetal, como os biocombustíveis (PEREIRA et al., 2012).

No processo de beneficiamento agroindustrial do amendoim são gerados produtos designados para o mercado interno ou externo, que podem ser o amendoim com casca e descascado, óleo bruto e refinado, torta, farelo e as sementes para o cultivo. A casca é considerada um subproduto abundante do processo de beneficiamento, porém apresenta baixo valor comercial. Em contrapartida, esse resíduo pode trazer benefícios econômicos, uma vez que dispõe de composição lignocelulósica que pode ser utilizado no aproveitamento e geração de novos produtos e materiais (BARBOSA; HOMEM; TARSITANO, 2014).

Segundo Gatani et al. (2013), a casca do amendoim representa 30% do peso total do grão. Por ser uma biomassa lignocelulósica abundante, tem despertado interesse na aplicação desses resíduos nos processos fermentativos para aquisição de produtos microbiológicos (BRITO, 2015).

3.10 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) consiste em um processo em que um microrganismo se desenvolve sobre ou dentro de uma matriz sólida que atua como fonte de

carbono e nitrogênio. A associação da matriz sólida, ou substrato, ao teor de água do sistema proporciona o crescimento microbiano, assim como, à produção de produtos biotecnológicos. No entanto, é importante que a quantidade de água utilizada não exceda a máxima capacidade de ligação com a matriz sólida (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SCHMIDELL et al., 2001).

Estudos iniciais voltados para a fermentação em estado sólido visavam à obtenção de biomoléculas de interesse. Todavia, com a descoberta da penicilina por volta de 1940 pelo o método de fermentação submersa (FSm), gerou certo desinteresse na utilização da FES por partes dos pesquisadores. O interesse foi restaurado a partir dos anos 70 por meio de pesquisas relacionadas à aplicação dos resíduos agroindustriais em ração animal enriquecida com proteínas (OLIVEIRA JÚNIOR, 2018).

De acordo com Sindhu et al. (2015), no processo de FES a escassez ou quase ausência de água livre no material sólido, simula o habitat natural de fungos, favorecendo o metabolismo e a capacidade reprodutiva. Portanto, essa técnica tem mostrado várias vantagens quando comparadas com a FSm para a produção de enzimas extracelulares, entre elas destaca-se, maior rendimento na produção, utilização de substratos de baixo custo para a produção de enzimas microbianas, redução do risco de contaminação e liberação de alguns compostos metabólicos essenciais em meios fermentados (RENGE et al., 2012).

Na FES é necessário escolher microrganismos que sejam promissores para o processo, diante disso, os fungos têm se destacado, sobretudo pela variedade de produtos metabólicos, bem como pelo crescimento das hifas que proporcionam maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre as partículas da matéria-prima (CORREA et al., 2009).

Renge et al.(2012) também ressalta que a FES possui elevado potencial na produção de enzimas sendo necessário considerar alguns fatores de controle para a obtenção da biomolécula, tais como, a seleção ideal do meio de cultura, o teor de umidade inicial, o pH, a temperatura, a presença de nutrientes e a quantidade de inóculo inserido.

A seleção do substrato é outro aspecto importante a ser considerado para obter uma produção eficiente e econômica no produto de interesse. Neste caso, é importante assegurar a disponibilidade e o custo do substrato, para que esse possa oferecer nutrientes apropriados e suporte físico para o crescimento microbiano. Entretanto, em alguns casos faz-se necessário a adição de suplementos ao substrato com a finalidade de auxiliar o desenvolvimento do microrganismo. Em outras situações é primordial o pré-tratamento químico ou mecânico

principalmente em materiais lignocelulósicos devido à inacessibilidade de alguns nutrientes pelos microrganismos (YAZID *et al.*, 2017).

A granulometria da partícula de substrato é outro parâmetro que deve ser levado em consideração. Quando o substrato apresenta partículas pequenas, fornece uma grande área superficial de suporte para fixação do microrganismo. No entanto, partículas muito pequenas podem promover o agrupamento do substrato e interferir na transferência de oxigênio prejudicando o desenvolvimento do microrganismo. Em contrapartida, o elevado tamanho embora forneça maior aeração, limita a área superficial para a fixação microbiana (CASTRO; SOUTO, 2015; YAZID *et al.*, 2017). O ideal é que o substrato apresente partículas heterogêneas de tamanho intermediário, já que esse parâmetro apresenta características essenciais para um consumo adequado de oxigênio bem como uma área superficial maior para o crescimento do microrganismo. Desta forma, para que o processo de produção de enzimas seja eficiente deve ser levado em consideração não apenas as escolhas corretas do substrato e os agentes biológicos, mas também os parâmetros físico-químicos do processo (SANTOS *et al.*, 2018).

De modo geral, a FES tem sido amplamente relatada na produção de diferentes bioprodutos como ácidos orgânicos, enzimas, biofertilizantes, biopesticidas, biossufactantes, bioetanol, compostos aromáticos, alimentos para animais, pigmentos, vitaminas e antibióticos, entre outros (YAZID *et al.*, 2017). Diante disso, essa técnica tem se destacado no ramo da biotecnologia visando o desenvolvimento de produtos de interesse industrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em Sumé - PB.

4.2 INÓCULO

O basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBt2611 utilizado pertence à Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Botânica, IBt, da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo (SMA/SP) do Estado de São Paulo (Figura 3). Este fungo foi isolado de basidioma encontrado em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, Região da Baixada Santista, SP (OKINO et al., 2000).

Figura 3 - *Lentinus crinitus* cultivado e frutificado em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farinha de soja - C/N180.



Fonte: (Marina Capelari, 2002)

O isolado de *L. crinitus* CCIBT 2611 foi cultivado em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) 2% (Tabela 1) e incubado a 28° C, até que o crescimento atingisse toda a placa de Petri (\cong 7 dias).

Tabela 1 - Composição do meio MEA

Componente	Quantidade
Extrato de malte	20g
Peptona	1g
Ágar	15g
Água destilada	qsp. 1000 mL

Fonte:Dados da pesquisa.

4.3 PREPARO DO SUBSTRATO

O substrato usado na realização dos experimentos foi a vagem de amendoim adquirido no comércio local da cidade de Sumé, Paraíba. A vagem do amendoim foi fragmentada manualmente. A umidade foi determinada utilizando-se o determinador de umidade (Shimadzu MOC 63U) por 15 minutos a 105°C e ajustadas pela adição de um volume definido de água destilada, considerando que a densidade da água é igual a 1 g.cm³, realizou-se o cálculo a partir da equação 1:

$$V_{AA}(g/cm^3) = m_{AA} = \frac{mi(U_2 - U_1)}{1 - U_2} \quad (1)$$

Em que:

V_{AA} : volume de água a ser adicionada ao meio

m_{AA} : massa de água a ser adicionada

mi = massa do meio a ser umidificado

U_1 = umidade do meio;

U_2 = umidade do meio desejada.

4.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO AJUSTE DA UMIDADE E DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE LACASE

Para a determinação do efeito da umidade do substrato e a da adição de óleo de soja para a produção da lacase de *L. crinitus* em FES foi utilizado um planejamento fatorial 2². Os níveis de umidade e de óleo de soja estão apresentados na Tabela 2. Os ensaios realizados

estão indicados na matriz do planejamento fatorial conforme tabela 3. A massa de 3 g da vagem de amendoim seca, utilizada como substrato, foi distribuída em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave por 40 min a 1atm, posteriormente adicionado cinco (5) círculos 0,5 mm de diâmetro do inóculo em condições assépticas. A FES teve duração de sete dias.

Tabela 2 – Níveis do planejamento experimental para a determinação do efeito da umidade e da adição do óleo de soja

Variável (%)	-1	0	+1
Umidade (b.u)	60	70	80
Óleo de soja (m:v)	0	2	4

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental

ENSAIOS	Umidade % (b.u)	Óleo de soja (%)
1	60 (-1)	- (-1)
2	80 (+1)	- (-1)
3	60 (-1)	4 (+1)
4	80 (+1)	4 (+1)
5	60 (-1)	- (-1)
6	80 (+1)	- (-1)
7	60 (-1)	4 (+1)
8	80 (+1)	4 (+1)
9	70 (0)	2 (0)
9'	70 (0)	2 (0)
9''	70 (0)	2 (0)

Fonte: Dados da pesquisa.

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Em frasco de Erlenmeyer adicionou-se 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 minutos. Em seguida agitados em mesa agitadora a 120 rpm durante 1 hora a 25 °C. O extrato enzimático foi obtido por filtração a vácuo utilizando papel filtro.

4.6 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS) a 420nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 10 minutos, em espectrofotômetro UV – 1000^a, seguindo o método descrito por Ballaminut (2007). A mistura de reação está expressa abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.

Componentes (mM)	Concentração (μL)
Tampão acetato de sódio (50)	450
ABTS (5)	150
Extrato Enzimático	900

Fonte:Dados da pesquisa.

4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA LACASE DE *L. crinitus*

A cinética de produção foi realizada na condição estabelecida com o planejamento fatorial indicado no item 4.4. A produção enzimática foi acompanhada durante 30 dias.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a quantificação das proteínas utilizou se 4 mL da solução reagente Biureto (0,15 % sulfato de cobre; 0,6 % tartarato de sódio e potássio; 3 % hidróxido de sódio; 0,1 % iodeto de potássio) e 1 mL da amostra, diluída de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. A mistura foi incubada em tubos de ensaio por 5

minutos. Após esse período as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi construída com soro albumina bovina líquida. O espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo 4 mL da solução reagente Biureto e 1 mL de água destilada (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH foi realizada no extrato enzimático obtido nos ensaios de cinética de produção de lacase, utilizando um medidor de pH digital da marca Instrumenthal, modelo pH3600.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE PRODUZIDA POR *L. CRINITUS* EM VAGEM DE AMENDOIM

O extrato enzimático obtido aos 6 dias de FES foi utilizado para a caracterização físico-química da atividade de lacase, bem como para avaliação do potencial do extrato bruto em degradar *in vitro* o corante Vermelho Congo.

4.10.1 Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação:

A determinação do pH ótimo foi realizada por meio da incubação de 1 mL de extrato enzimático em presença de 1 mL de soluções tamponantes McIlvaine (McILVAINE, 1921), no intervalo de pH de 2,2 a 6,6. A temperatura ótima foi realizada por meio da incubação do extrato enzimático nas temperaturas de 30 a 80°C, no pH ótimo, durante 1 minuto. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.10.2 Determinação da estabilidade ao pH:

Adicionou-se 1 mL de extrato enzimático e 1 mL da solução tampão McIlvaine 3,0 e 4,0 e incubou-se nos intervalos de 0, 3, 6, 24, 36 e 72 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.10.3 Determinação da estabilidade térmica:

O extrato enzimático bruto foi incubado em banho-maria nas temperaturas de 30 °C a 80 °C, no pH ótimo. Em seguida, foi determinada a atividade de lacase residual. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.11 DESCOLORAÇÃO IN VITRO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO POR *L. crinitus* DURANTE FES EM VAGEM DE AMENDOIM

O extrato enzimático bruto foi incubado a 25°C na presença de diferentes concentrações do corante VC e de CuSO₄, na ausência de luminosidade, durante 24 horas. Para isso utilizou-se um planejamento fatorial 2², com triplicata no ponto central, totalizando sete (7) ensaios. Os níveis das variáveis independentes e a matriz do planejamento são mostrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Níveis do planejamento experimental na avaliação do potencial do extrato bruto de *L. crinitus* de degradar *in vitro* do corante Vermelho Congo.

Variável	-1	0	+1
Concentração do corante (mg . L ⁻¹)	20	40	60
Concentração CuSO ₄ (mM)	0	0,5	1

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 6 - Níveis do planejamento experimental usado para estudar a degradação *in vitro* do corante Vermelho Congo.

ENSAIOS	Corante VC (mg. L ⁻¹)	Concentração de CuSO ₄ (mM)
1	20 (-1)	- (-1)
2	60 (+1)	- (-1)
3	20 (-1)	1 (+1)
4	60 (+1)	1(+1)
5'	40 (0)	0,5 (0)
5''	40 (0)	0,5 (0)
5'''	40 (0)	0,5 (0)

Fonte: Dados da pesquisa.

A constituição do meio reacional para a descoloração do corante VC está apresentada na tabela 7. No caso dos ensaios 1 e 2, o volume referente à solução de CuSO_4 foi substituída pelo mesmo volume de solução tampão.

Tabela 7 - Composição do meio reacional para determinação da descoloração in vitro do corante vermelho Congo.

Componentes	Concentração (μL)
Extrato enzimático	1000
Tampão	250
Sulfato de cobre	250
Corante	150

Fonte: Dados de pesquisa

Como controle da descoloração utilizou-se o extrato enzimático aquecido por 5 min a 80°C . A descoloração do corante foi determinada por leitura da absorbância em espectrofotômetro. A porcentagem de descoloração em cultura foi calculada de acordo com a Equação 2 (BRUSCATO, 2011):

Equação 2:

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{teste}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo que:

A_{teste} : absorbância do teste de descoloração a 340nm

A_{controle} : absorbância do controle a 340nm

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

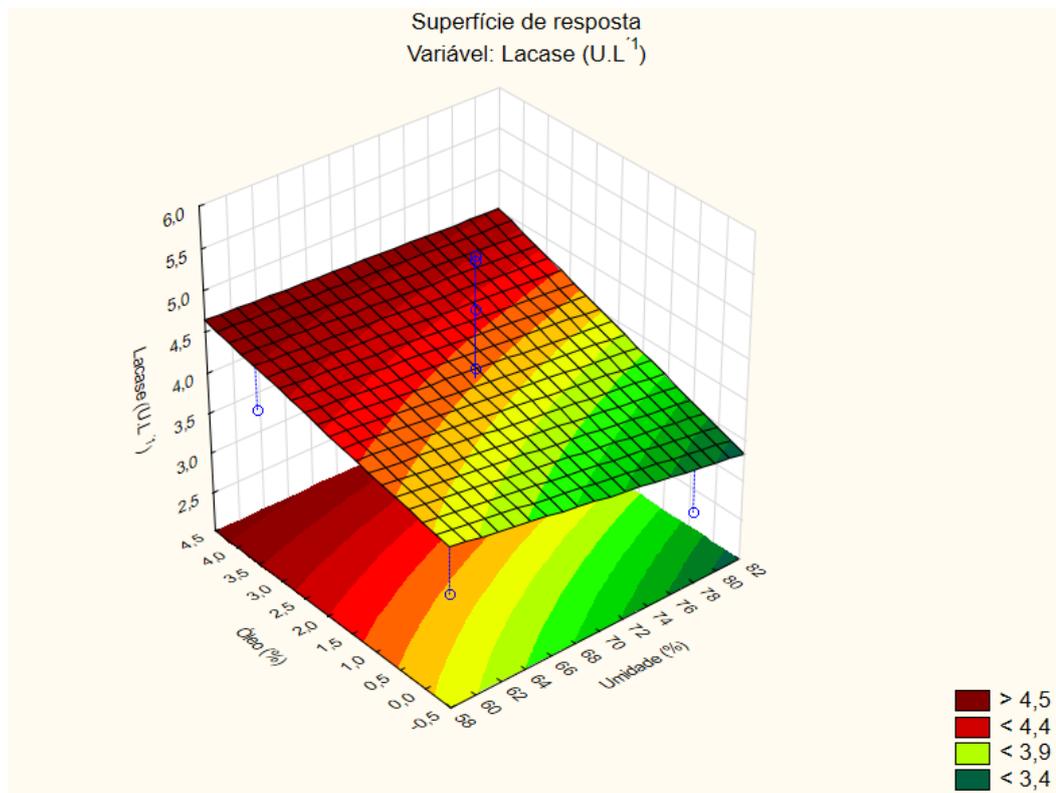
Os resultados foram analisados por meio de análises de variância (ANOVA) e de gráficos gerados pelos programas computacionais *Statistica* TM (Versão 8.0, da *Statsoft*, Inc.), Minitab18, Origin Pro 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *L. crinitus* EM FES UTILIZANDO VAGEM DE AMENDOIM PARA A PRODUÇÃO DE LACASE

A produção de lacase (variável dependente) por *L. crinitus* em vagem de amendoim foi avaliada diante das variáveis independentes (concentrações de óleo de soja e porcentagens de umidade-b.u). No Gráfico 1 Verifica-se que as maiores concentrações de óleo de soja ajustada proporcionaram maior atividade enzimática.

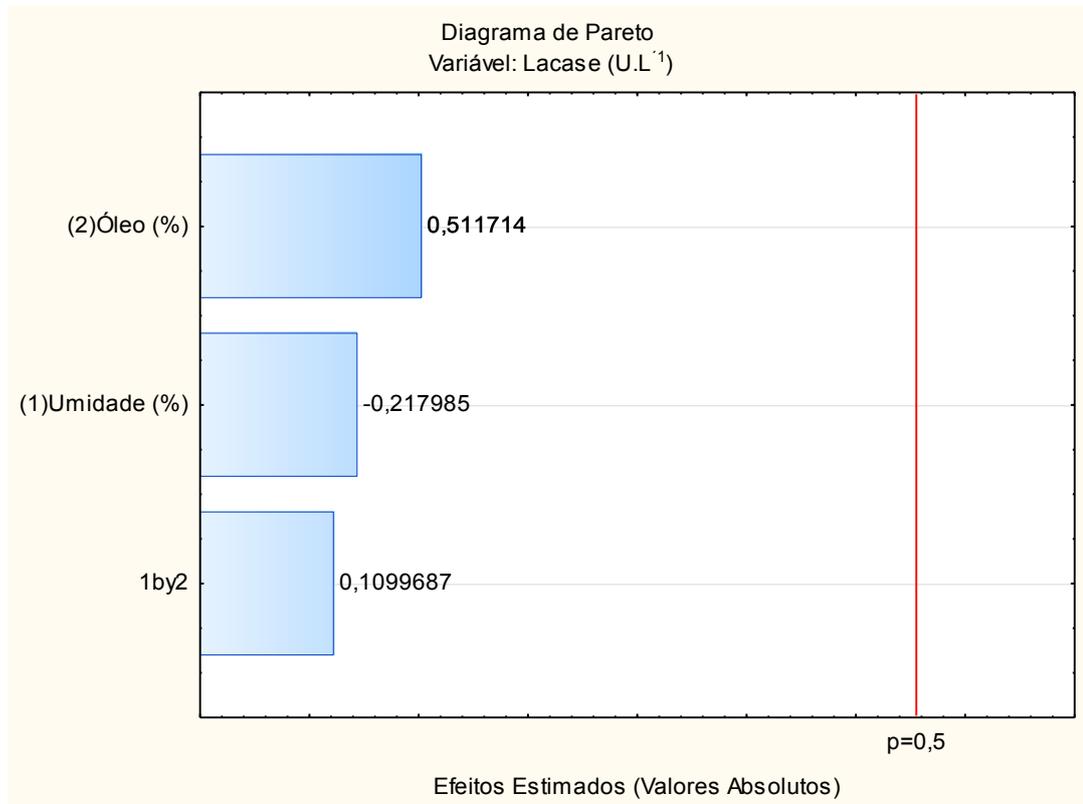
Gráfico 1 - Superfície de resposta do planejamento 2^2 para avaliar o efeito do ajuste da umidade e da adição de óleo de soja ao substrato sobre a produção de lacase.



Fonte: Dados da pesquisa.

No entanto, o diagrama de Pareto (Gráfico 2) indicou que os efeitos das variáveis estudadas não influenciaram a produção de lacase, de forma estatisticamente significativa.

Gráfico 2 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes (umidade e óleo de soja) sobre a variável dependente (produção de lacase).



Fonte: Dados da pesquisa.

Devido ao fato do planejamento fatorial não ter apresentado resposta significativa, quanto a determinação das melhores condições de produção de lacase por *L. crinitus*, realizou-se um teste de Tukey (Tabela 8) para determinar tais condições. O teste de Tukey mostrou que o ensaio 5, com 2% de óleo de soja e umidade de 70% (b.u), além de apresentar os maiores valores de atividade de lacase (5,55 U.L⁻¹) também foi significativamente diferente dos demais ensaios. Diante desse resultado, as condições empregadas no ensaio 5 foram escolhidas para as etapas seguintes da pesquisa, pois além de ser estatisticamente significativo em relação às demais condições, utiliza uma quantidade intermediária de óleo de soja, o que é essencial para a redução de custos do processo.

Tabela 8 - Informações de agrupamento usando o método de Tukey com confiança de 95% para avaliação da melhor condição de produção da lacase. Letras diferentes indicam diferença estatística. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

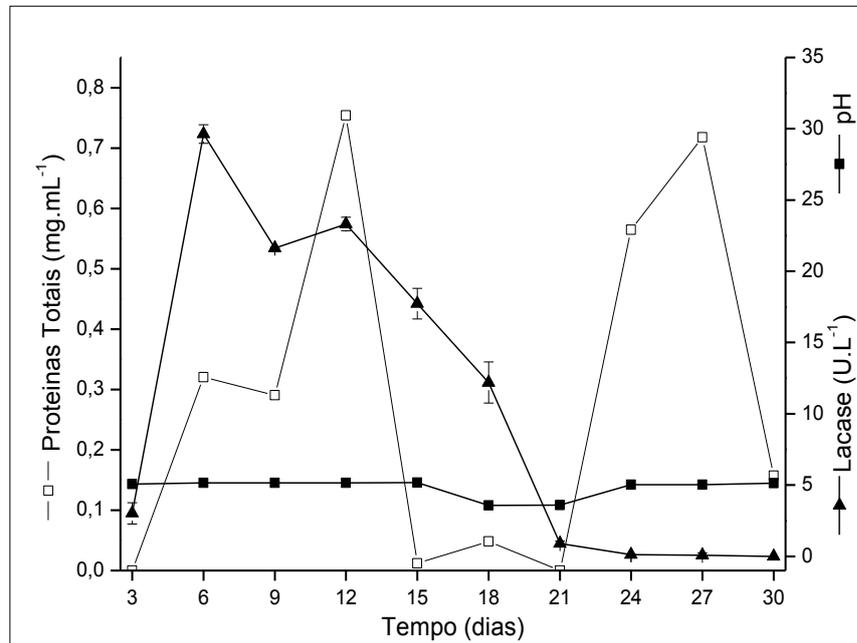
Ensaio	Atividade de lacase (U.L ⁻¹)	Desvio padrão
5	5,703 ^a	0,238
4	4,189 ^b	0,448
3	4,062 ^b	0,256
2	2,545 ^c	0,271
1	3,136 ^{b,c}	0,721

Fonte: Dados da pesquisa

5.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO

A cinética de produção da enzima lacase foi avaliada empregando-se as condições do ensaio 5 com umidade de 70% e 2% de óleo de soja. No Gráfico 3 observa-se que a produção da lacase ocorreu a partir do terceiro dia de fermentação e o pico de produção dessa enzima foi no sexto dia de fermentação com atividade de 29,63 U.L⁻¹. Após esse intervalo, observou-se uma tendência reducional na produção da lacase. O teor de proteínas totais apresentou dois picos durante a fermentação, o primeiro com doze (12) dias e o segundo com vinte e sete (27) dias de cultivo, com valores de 0,81 mg. mL⁻¹ e 0,72 mg. mL⁻¹, respectivamente, indicando a presença de outras proteínas, além da lacase no extrato bruto. O pH manteve-se estável por volta de 5,0, dos 18° ao 21° dias de fermentação, o pH ficou em torno de 3,0.

Gráfico 3 - Perfil da cinética de produção de lacase. Atividade de lacase tendo o ABTS como substrato; Determinação de proteínas pelo método de Biureto usando soro albumina bovina como padrão. Os testes foram realizados em triplicata.

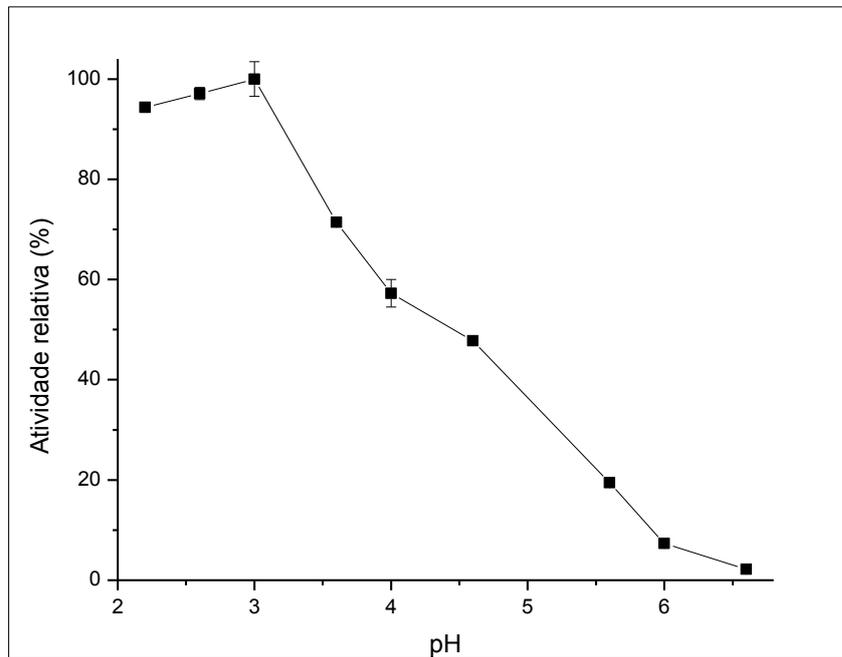


Fonte: Dados da pesquisa

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA LACASE BRUTA PRODUZIDA POR *L. crinitus* EM VAGEM DE AMENDOIM COMO SUBSTRATO

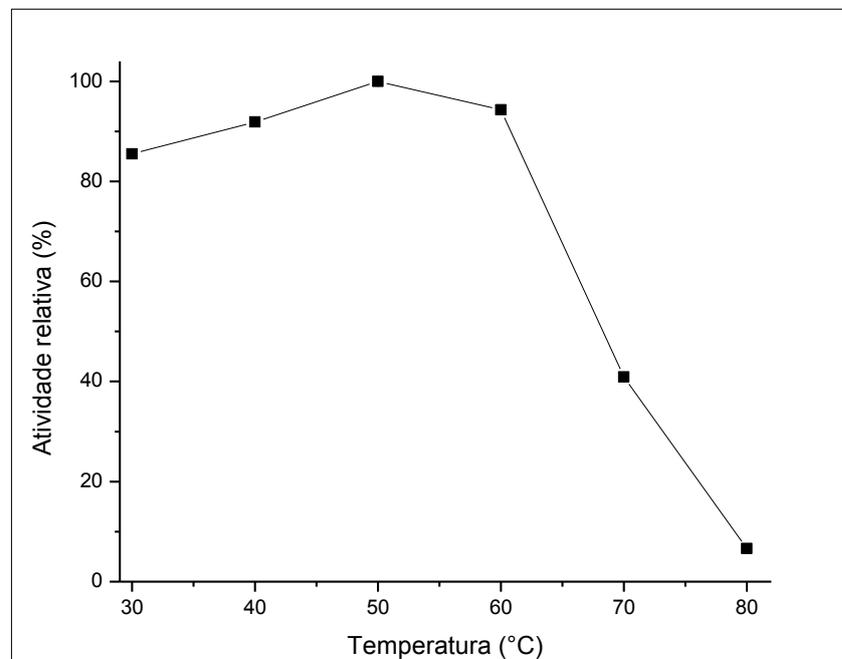
Para a realização da caracterização enzimática foi utilizado o extrato obtido a partir do sexto dia de incubação de *L. crinitus* em vagem de amendoim com 70 % de umidade e adicionado de 2% de óleo de soja (m:v). Os perfis de temperatura e pH ótimos estão apresentados nos gráficos 4 e 5. Na figura 7 verifica-se que a máxima atividade relativa foi em pH 3,0 e que a atividade de lacase foi reduzida com o aumento do pH. Sendo que em pH 6,6 a atividade relativa decaiu cerca de 98%. O perfil do efeito da temperatura sobre a atividade de lacase (Figura 8) indica que a temperatura ótima foi determinada em 50°C, sendo que a 60°C foi verificada que a enzima apresentou 94% de sua atividade relativa.

Gráfico 4 - Efeito do pH sobre a atividade da lacase de *L. crinitus* durante seis dias de fermentação utilizando o amendoim como substrato. Utilizou-se tampão McIlvaine da faixa de 2,2 a 6,6. As barras indicam desvio padrão de duplicata.



Fonte: Dados da pesquisa

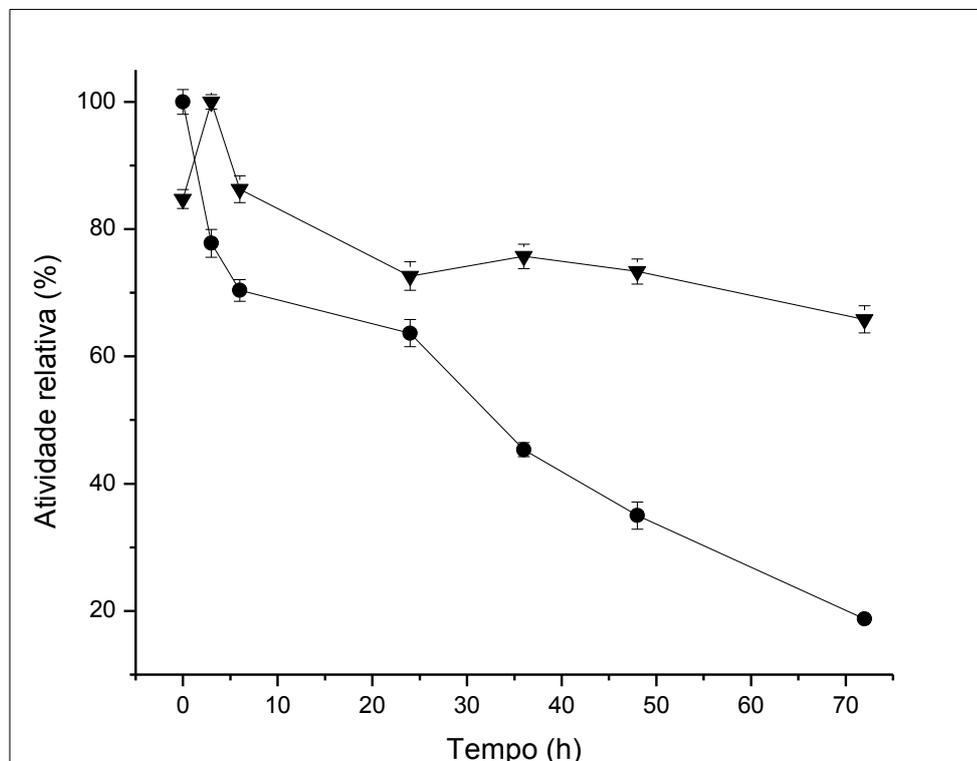
Gráfico 5 - Efeito da temperatura sobre a atividade de lacase de *L. crinitus* determinada no pH ótimo. Os ensaios foram realizados em duplicata



Fonte: Dados da pesquisa

A estabilidade do pH foi avaliada no pH 3,0 (pH ótimo) e no pH 4,0 (Gráfico 6). A enzima apresentou meia vida ($T_{1/2}$) de 33 horas no pH ótimo a 25°C. A estabilidade da lacase foi mais baixa em pH 3,0, apresentando atividade enzimática em torno de 65% no intervalo de tempo de 24h. Após esse período, verifica-se desnaturação mais intensa, com uma redução de 80% da atividade relativa após 72 h. No pH 4,0 a enzima apresentou maior estabilidade, com atividade enzimática em torno de 65% após 72h.

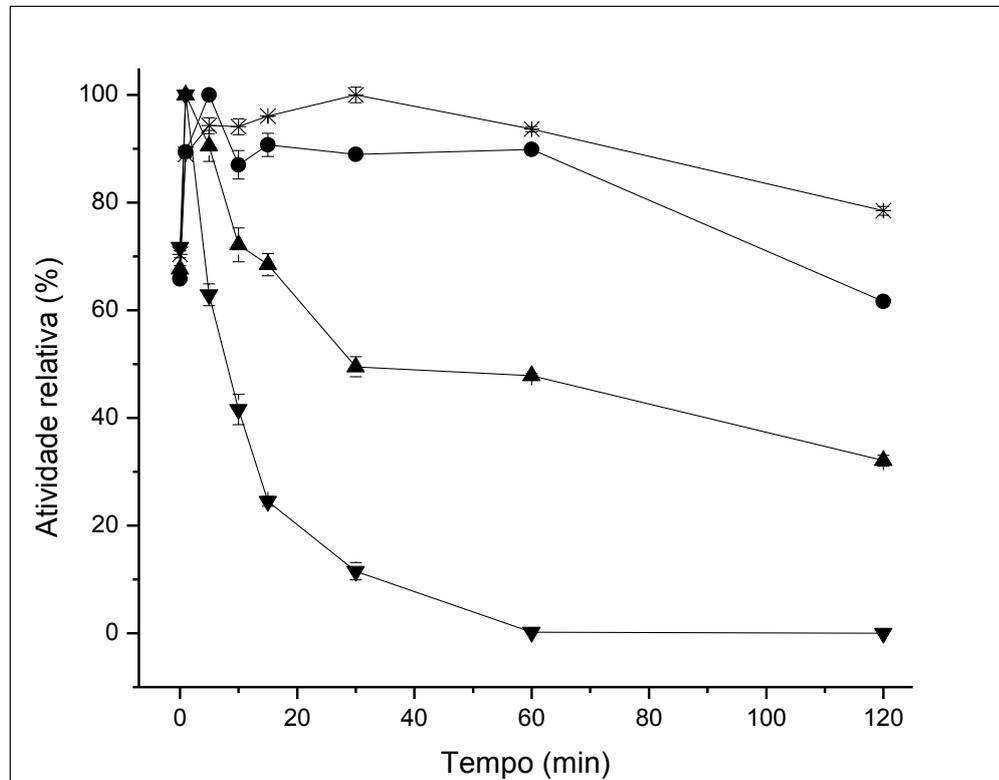
Gráfico 6 - Perfil de estabilidade da lacase de *L. crinitus* frente a variação do pH 3,0 (—●—) e pH 4,0 (—▼—). Os testes tiveram ABTS como substrato. As barras indicam desvio padrão entre duplicatas.



Fonte: Dados da pesquisa

A estabilidade térmica da lacase do fungo *L. crinitus* foi avaliada na faixa de temperatura de 30°C a 60°C, como pode ser observada no Gráfico 7. Nas temperaturas de 30°C e 40°C a enzima apresentou alta estabilidade, tendo sido mantida 80 e 60 % da atividade relativa, respectivamente, com 120 min de incubação. Nas temperaturas de 50°C e 60°C verificou-se meia vida ($T_{1/2}$) de cerca de 30 min e 6 min, respectivamente. Após 120 min de incubação, na temperatura ótima (50°C) foi mantida cerca de 40% da atividade de lacase.

Gráfico 7 - Estabilidade da atividade de lacase de *L. crinitus* na faixa de temperatura de 30°C (— X —), 40 °C (—●—), 50 °C (—▲—), 60 °C(—▼—). A incubação foi realizada em banho-maria no pH ótimo (3,0). Os testes tiveram ABTS como substrato. As barras indicam desvio padrão entre duplicatas.

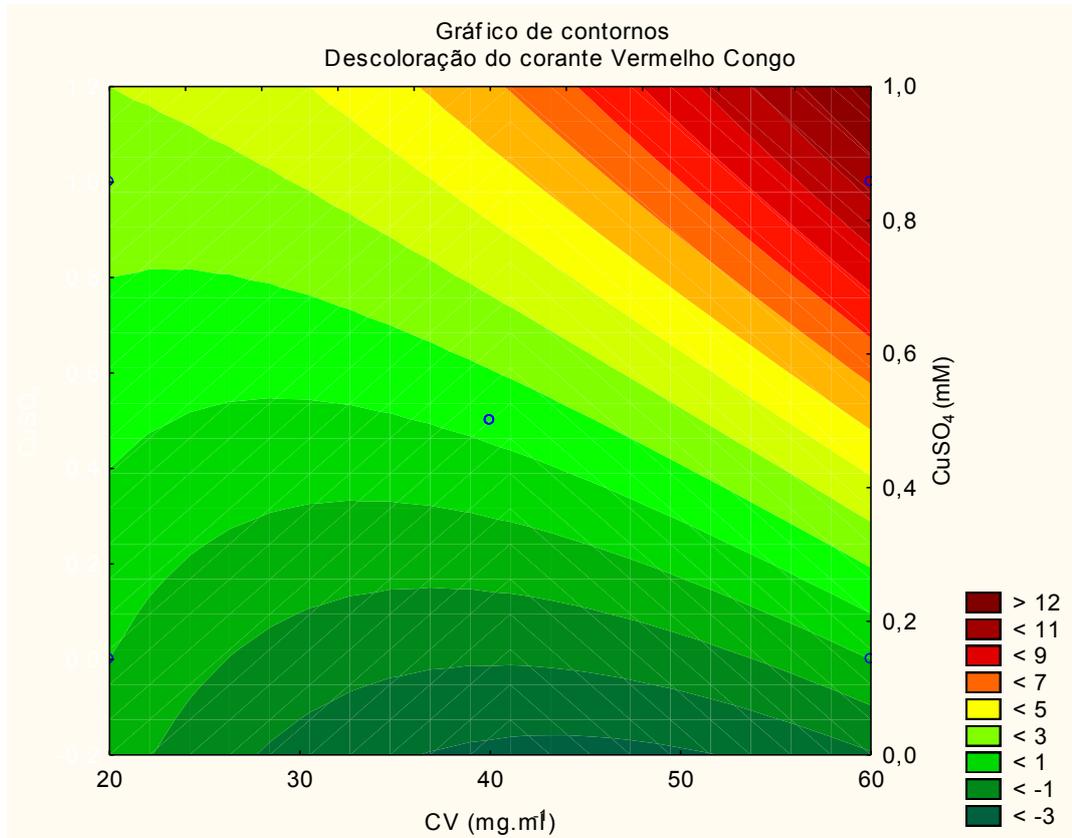


Fonte: Dados da pesquisa

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO DE *L. crinitus*

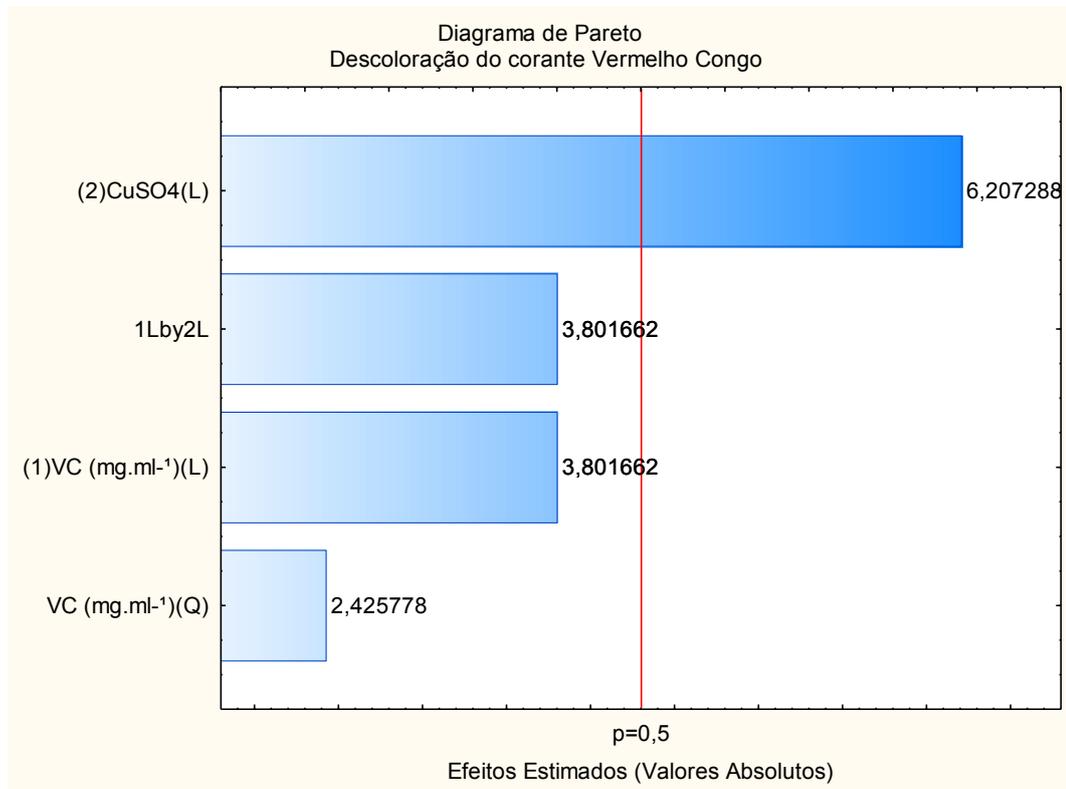
O efeito das concentrações do corante e da adição de CuSO_4 sobre a descoloração do corante vermelho Congo está apresentada no gráfico de superfície de contornos (Gráfico 8). Percebe-se que a concentração inicial do corante não influenciou a descoloração, por outra via, as doses crescentes de CuSO_4 adicionadas ao meio reacional influenciaram a descoloração do corante Vermelho Congo, como pode ser confirmada pelo diagrama de Pareto (Gráfico 9).

Gráfico 8 - Gráfico de contorno do planejamento²² para a avaliação do efeito das diferentes concentrações de VC e CuSO₄ sobre a descoloração do corante.



Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 9 - Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes (concentrações de corante VC e CuSO_4) sobre a variável dependente (descoloração). A faixa vermelha indica o efeito significativo no nível de confiança de 95%.



Fonte: Dados da pesquisa

5 DISCUSSÃO

No processo fermentativo, o fungo *L. crinitus* foi capaz de sintetizar a enzima lacase durante crescimento em vagem de amendoim. Vários fatores influenciam a produção enzimática e a formação de produtos microbianos, dentre eles, a composição do meio de crescimento, o pH, o tempo de cultivo, a relação C/N, a temperatura, a natureza química do substrato, a luminosidade, a aeração (IKEHATA; BUCHANAN SMITH, 2004).

A produção enzimática por FES tem o teor de umidade como fator influenciador no crescimento do microrganismo em baixa atividade de água (OSMA et al., 2011). Yazid e colaboradores (2017) afirmam que o baixo teor de água pode limitar a solubilidade dos nutrientes e inibir o crescimento do microrganismo. Em contrapartida, a elevada quantidade de água reduz a porosidade proporcionando perda da estrutura das partículas e interferir na difusão do oxigênio. Dessa forma, é importante trabalhar com quantidade intermediária de umidade para que mantenha o equilíbrio entre a disponibilidade de água, expansão do substrato e efeitos de difusão do oxigênio (OLIVEIRA JÚNIOR, 2014). Ainda o ajuste na quantidade de água também pode evitar possíveis contaminações (AFONSO, 2012).

O uso da vagem de amendoim, é também citado na literatura como fonte de carbono para crescimento fúngico e produção enzimas celulolíticas por fungo filamentoso (BRITO, 2015).

Na FES, o enriquecimento e o pré tratamento do substrato estão sendo adotados como fontes alternativas para aumentar o fornecimento de nutrientes nos quais permitem que os microrganismos cresçam com maior facilidade (SANTOS et al., 2018). COSTA et al. (2017) adicionaram glicose, glicerol e óleo de soja com intuito de enriquecer os resíduos agroindustriais e obtiveram produção máxima de enzima lipase por *Aspergillus niger*. Machado et al. (2006 b) adicionaram óleo vegetal no meio de cultivo para avaliar o crescimento de *L. crinitus*, e constaram que a adição do óleo aplicado ao inóculo do basidiomiceto favoreceu o crescimento. Esses autores também relataram que o óleo é uma fonte energética de fácil absorção pelos fungos.

Genero e colaboradores (2016) avaliando as condições de cultivo do fungo *Pleurotus pulmonarius* em FES suplementada com óleo vegetal residual nas concentrações de 3 e 6% concluíram que ocorreu redução na quantidade de óleo presente no meio em concentração de 3%. Os autores destacaram que a concentração da fonte de carbono interfere diretamente no crescimento dos fungos, e na produção enzimática da lacase.

Dekker e colaboradores (2007) utilizaram óleo de soja (1,0 %, v:v) no meio de cultivo para produzir lacase pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, e verificaram que o fungo produziu uma quantidade superior de enzima ($1,74 \text{ U.mL}^{-1}$) quando comparada à produção no meio de cultivo contendo glucose ($0,36 \text{ U.mL}^{-1}$) como fonte de carbono.

SACCHETO (2009) avaliando a produção da enzima lacase em diferentes concentrações de óleo de soja (0%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2%) concluiu que a maior produtividade da enzima ocorreu na concentração de 1%. De acordo com o autor, elevadas concentrações de carbono promovem desvio metabólico afetando a produtividade da biomassa fúngica.

O pico de produção no presente estudo mostrou-se superior ao trabalho desenvolvido por Ballaminut (2007) em que foi obtida uma produção máxima correspondente a $17,59 \text{ U L}^{-1}$ de lacase em FES pelo fungo *L. crinitus* com 10 dias de cultivo, utilizando como substrato bagaço de cana de açúcar, suplementado com farinha de soja (C/N 90). Entretanto, Silva et al. (2017), na avaliação da produção enzimática de *L. crinitus* utilizando o bagaço de coco suplementado com farinha de soja, obteve produção máxima de enzima lacase no sexto dia fermentação com $174,01 \text{ U.L}^{-1}$. Ballaminut (2007) observou que a produção enzimática do fungo *L. crinitus* ocorreu nos primeiros 20 dias destacando que esse é o período favorável para aplicação do inóculo na degradação de xenobióticos. De acordo com Santos et al. (2013), o tempo de fermentação está relacionado com o esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo que proporciona decréscimo no crescimento microbiano inviabilizando a conversão da biomassa em produtos, como resultado a produção de enzimas é reduzida.

Durante a cinética de produção de lacase verificou-se uma diminuição nos pH dos extratos provenientes do cultivo de *L. crinitus* em vagem de amendoim. De forma geral, observa-se uma redução do pH no decorrer da fase de intenso crescimento microbiano e, após essa etapa, há aumento nos valores de pH (GALIOTOU-PANAYOTOU et al., 1997; MALVESSI; SILVEIRA, 2004; FONTANA; SILVEIRA, 2012; MENEGHEL et al., 2014). A acidificação do meio pode estar ligada à formação de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo (ALVES, 2010).

O pH ótimo da lacase de *L. crinitus* está de acordo com o verificado para as lacases de *Pleurotostreatatus* (PAKHADNIA et al., 2009) e *Pleurotussajor-caju* (RAMPINELLI, 2016), cujo valor do pH ótimo foi 3,0. Segundo Baldrian (2006), o valor de pH ótimo da lacase de fungos basidiomicetos encontra-se entre 2,2 e 4,0. pH ótimo de lacase abaixo de 3,0 foi evidenciado por Coelho (2007), que encontrou pH ótimo de 2,5 para lacase produzida por *P*

castanella, com redução na atividade enzimática com o aumento do pH, comportamento semelhante aos resultados obtidos neste trabalho.

A temperatura ótima da lacase de *L. crinitus* corrobora com as temperaturas ótimas de outras lacase de fungos basidiomicetos (BALDRIAN, 2006; COELHO, 2007; STRONG e CLAUS, 2011; BETTIN et al., 2011; CUNHA, 2014; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; RAMPINELLI, 2016). A redução da atividade de lacase em valores acima da temperatura ótima pode estar associada à perda dos íons de cobre presentes no núcleo da proteína (PALONEN et al., 2003). Acima de 50 °C, ocorre o aumento da agitação das moléculas, aumentando consequentemente, as colisões entre substrato e enzima, promovendo assim, uma alteração na rota bioquímica da enzima. Nesse sentido, a velocidade de reação diminui, devido à desnaturação da enzima pelo calor (HARPER et al., 1982).

A lacase de *L. crinitus* mostrou-se mais estável no pH ótimo do que a lacase de *P.sajor caju* que apresentou $T_{1/2}$ de aproximadamente 2,5 horas (RAMPINELLI, (2016) e a lacase do *Pleurotus ostreatus*, com $T_{1/2}$ de cerca de 0,5 horas (DAS et al., 2016). Para Moreira-Neto (2006) a meia vida em 55°C das atividades de lacases e peroxidases de *P. castanella foi* entre 1,5 e 5,5 horas, exceto a atividade de lacase produzida com 19 dias de crescimento do fungo em solo-HCB ($t_{1/2} > 12$ h) 60% da atividade residual. A termoestabilidade das lacases produzidas por fungos apresentam variabilidade de acordo com as espécies (STRONG; CLAUS, 2011).

A descoloração de corantes *in vivo* por fungos do gênero *Lentinus* produtores de lacase está bem documentada na literatura (MOREIRA - NETO, 2013; BALLAMINUT et al., 2014; ALMEIDA et al., 2018). No entanto, a aplicação de tecnologias enzimáticas *in vitro* traz a possibilidade de tratamento do efluente sem que um microrganismo aloctone seja introduzido em um novo ecossistema.

No presente estudo, o extrato bruto do *L. crinitus* descoloriu 10,4% do corante Vermelho Congo em 24h. O resultado obtido foi superior ao verificado para descoloração de corantes vermelhos por outros fungos basidiomicetos. A lacase de *Pycnoporus sanguineuse* descoloriu 3,8% da solução do corante azóico vermelho 195 em 24h, a 28°C na ausência de luz (FABRINI et al., 2016). O extrato bruto, contendo lacase de *Pleurotus sajor-caju* descoloriu 5,2% do corante Red 50 em 24 horas (ORZECOWSKI et al., 2018). Os corantes diazo apresentam resistência ao tratamento enzimática precisando de longo período de incubação para que sejam descoloridos (FOROOTANFAR et al., 2012).

A adição de concentrações crescentes de CuSO_4 influenciou na descoloração do corante Vermelho Congo. De acordo com a literatura, o CuSO_4 é reconhecido como um dos mais importantes mediadores da atividade de lacase (STRONG; CLAUS, 2011; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; YANG et al., 2017).

6 CONCLUSÕES

O fungo *L. crinitus* é capaz de produzir lacase usando vagem de amendoim como substrato;

A variação da umidade e a adição de óleo de soja ao substrato não influenciaram significativamente a produção de lacase por *L. crinitus*, no entanto, a melhor produção de lacase ocorreu em uma quantidade intermediária de óleo de soja e 70% de umidade.

A máxima produção da lacase ocorreu aos seis dias de cultivo;

A lacase de *L. crinitus* apresenta temperatura e pH ótimos de acordo com o indicado pela literatura.

Enzima apresenta $T_{1/2a}$ 50°C o que possibilita a sua aplicação em processos industriais que ocorram nessa temperatura;

A descoloração do corante vermelho Congo pelo extrato bruto de *L. crinitus* reforça a importância do uso do CuSO_4 como agente mediador da atividade de lacase.

Os resultados apontam para o potencial de aplicação da lacase de *L. crinitus* na degradação de corantes azóicos.

REFERÊNCIAS

- ABIT – Associação Brasileira da Indústria Têxtil. **O poder da moda** Disponível em: <<http://www.abit.org.br/adm/arquivo/publicacao/120429.pdf>>. Acesso em 05 nov. 2018.
- ABIT– Associação Brasileira da Indústria Têxtil. **Indústria Têxtil e de Confecção • Brasileira.2013.**Disponível em:<http://www.abit.org.br/conteudo/links/publicacoes/cartilha_rtc_c.pdf>Acesso em 27 out. 2018.
- AFONSO, L.C. Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- AGHIZIONINBAKANI, S.; NIRMALA, S.; SIVA, R. Biodegradation of Congo red Dye by the Mushroom *Tricholoma* Species .**International Journal of Life Sciences Research.** v. 3, p: 57-62, 2015.
- ALMEIDA, E. J. R.; DILARRI, G. ; CORSO, C. R. . **A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes.** Projeto Qualidade da Água, Boletim das Águas - Ministério Público Federal, Brasília/DF, p. 1 - 18, 23 nov. 2016.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R. ; ROSA, M. A.; DURAN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818 - 824, 2004.
- ALMEIDA, P. H., OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, G. P. N. D.; J. C. FRIEDRICH.; LINDE,G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Decolorization of remazol brilliant blue r with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. v. 90, p. 1–11, 2018.
- ALVES, F. **Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes Versicolor* para produção de enzima lacase.** 80p Dissertação de Mestrado. Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2010.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, São Paulo, v.35, n.3 – setembro. 2010. doi: 10.1590/s0100-46702010000300002.

ARAGÃO, E. F. et al. **O Fiar e o Tecer: 120 anos da indústria têxtil no Ceará**. Cap.1. A evolução do processo de fiação e tecelagem, p. 45 – 61. Federação das Indústrias do Estado do Ceará - FIEC. Sindicato das Indústrias de Fiação e Tecelagem em Geral no Estado do Ceará – Sinditêxtil. Fortaleza – CE, 2002.

AXELSON, G.K; GIORGADZE, T; YOUNGBERG, G.A. Evaluation of the use of Congo red staining in the differential diagnosis of *Candida* vs. various other yeast-form fungal organisms. **Journal of Cutaneous Pathology**. V.35, p.27-30, 2008. Doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00769.x

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

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, São Paulo, 2007.

BALLAMINUT, N., MACHADO, K.M.G., OLIVEIRA, L.H.S. & MATHEUS, D. R. Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 57, p. 561-570, 2014.

BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C. L.; GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J.; Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors. Washington, DC: U.s. Army Corps of Engineers 61 p, 1995.

BARBOSA, R. M.; HOMEM, B. F. M.; TARSITANO, M. A. A. Custo de produção e lucratividade da cultura do amendoim no município de Jaboticabal, São Paulo. **Rev. Ceres**, v. 6, n. 4, Viçosa July/Aug. 2014. doi: 10.1590/0034-737X201461040005.

BASTIAN, E. Y. O. **Guia técnico ambiental da indústria têxtil**. São Paulo: CETESB; SINDITEXTIL, 85 p, 2009.

BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; SCHRORR, W. Electrochemical decolourization of dispersed indigo on boron-doped diamond anodes, **Diamond Relat. Mater.** 15, 2006, 1513-1519. doi: 10.1016/j.diamond.2005.12.026

BENNHOLD H. Excretion of intravenously injected Congo red in different diseases, especially amyloidosis [in German]. **Deutsches Archiv für Klinische Medizin**. v. 142, p.32–46. 1923

BETTIN, F.; ROSA, L.O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 758–764, 2011. doi: 10.1016/j.procbio.2010.12.002

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R.C. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciencia. 2008.

BÖTTIGER P. DEUTSCHES REICHS PATENT [German Imperial Patent] 28753. August 20, 1884.

BRADHA, M.; VIJAYARAGHAVAN, T.; SURIYARAJ, S. P.; SELVAKUMAR, R.; ASHOK, A, M. Synthesis of photocatalytic $\text{La}_{(1-x)}\text{A}_x\text{TiO}_{3.5-\delta}$ (A = Ba, Sr, Ca) nano perovskites and their application for photocatalytic oxidation of congo red dye in aqueous solution. **Journal of Rare Earths**. v.33, n.2, p. 160-167, 2015. doi: 10.1016/S1002-0721(14)60397-5

BRASIL Política Nacional de Resíduos Sólidos.. *Lei n° 12.305, de 2 de agosto de 2010*. Presidência da República, Departamento da Casa Civil. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm> Acesso em 30 novembro de 2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução no 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasil, 2005.

BRITO, A. R. **Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim**. 2015. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2015.

BRUSCATO, E. C. **Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos na Descoloração de Corantes da Indústria Têxtil**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

CAMPOS, E. S. **Seleção e Avaliação de Pseudomonas para a Descoloração de Corantes Têxteis por Cultivo Submerso**. 2010. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

CARBUCCI, L.V. **Degradação de fração aromática da Gasolina em águas subterrâneas e superficiais**. Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007

CARMEN, Z.; DANIELA, S. Textile organic dyes – characteristics , polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents – a critical overview. In: PUZYN,T e MOSTRAG-SZLICHTYNG, A. (Ed). Organic pollutants ten years after the stockholm convention- environmental and analytical update:In Tech, 2012. doi: 10.5772 / 32373 Disponível em:<https://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/textile-organic-dyes-characteristics-polluting-effects-and-separation-elimination-procedures-from-in>

CARNEIRO, D.A.; GARIGLIO L.P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Revista Tecer** - Belo Horizonte – vol. 3, n.4, maio, 2010.

CASTRO, A.N.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n.1, p.181-188, 2010. doi:10.1590/S0100-40422010000100031

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. *Waste and Biomass Valorization*, v. 6, p.1085– 1093, 2015.

CHEQUER, F. M. D.; OLIVEIRA, G A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes: dyeing process and environmental Impact. In GÜNAY, M. (Ed.). Eco-friendly textile dyeing and finishing: In Tech, 2013. doi: 10.5772/53659.

COELHO, G.D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB 444 durante o crescimento em solo**. 2007. 124F. Tese (Doutorado em biodiversidade vegetal e meio ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 2007.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Acompanhamento da safra brasileira de grãos. n.9 , v. 4 n.9, junho, 2017

CORREA, L. S.; ROCHA, C. P. COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EMINICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais...** [S.l.:s.n.], 2009. Disponível em: <<http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/96321501.pdf>>. Acesso em:17 nov. 2018.

COSTA, T.M., HERMANN, K.L., GARCIA-ROMAN, M., VALLE, R. DE C.S.C., TAVARES, L.B.B. lipase production by aspergillus niger grown in different agroindustrial wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419 - 427, 2017.

COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**. v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003

CUNHA, L. F. **Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno (pp) e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *psilocybe castanella* (ccibt 2781) na fermentação semissólida**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

DAS, A.; BHATTACHARYA, S.; PANCHANAN, G., NAVYA, B. S.; NAMBIAR, P. Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. **J. Genet. Eng. Biotechnol.**v.14, p. 281–288, 2016.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA A.M.; GIESE, E.C.; GODOY S.D.S.; COVIZZI, L.G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Int Microbiol**. V. 10, p.177-185. 2007.doi: 10.2436/20.1501.01.25

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana-SP.**, 2003, 137f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

- DIVRY P. Etude histochemique des plaques seniles [Histochemical study of senile plaques]. *J Belge de Neurologie et de Psychiatrie*. v.27, p.643–657. 1927.
- DUARTE, E. A. A.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.17, n.8, p.843–847, 2013.
- EGGEN, T.; MAJCHERCZYK, A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 41, n. 2, p. 111-117, 1998. doi:10.1016/S0964-8305(98)00002-X
- EMPRAPA**- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Sistema de Produção. 2014. Disponível em: < <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em 17 de novembro de 2018.
- FABRINI, F. F.; AVELINO, K. V.; MARIM, R. A.; CARDOSO, B. K.; COLAUTO, G. A. L.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo a base de melaço soja. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 3, p. 159-164, jul./set. 2016.
- FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** v.29, p. 683-690, 2012.
- FOROOTANFAR, H.; MOEZZI, A.; MARZIEH, A-K.; MAHMOUDJANLOU, Y.; AMERI, A.; NIKNEJAD, F.; MOHAMMAD A. F. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. **Iraniano J Environ Health Sci Eng.** 9 (1): 27. 2012. doi: 10.1186 / 1735-2746-9-27
- FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated. **World Enzymes: industry study with forecasts for 2015 and 2020**.2011. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/brochure/28xx/2824smwe.pdf>> Acesso em: 07/12/2018.
- GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.47, p. 425-429, 1997.
- GATANI, M. P; FIORELLI, J.; MEDINA, J. M.; ARGUELLO, R.; RUIZ, A.; NASCIMENTO, M. F.; SALVASTO JR., H.; Viabilidade técnica de produção e propriedades de painéis de partículas de casca de amendoim. *Revista Matéria*, v. 18 (2), p. 1286-1293, 2013.

- GENERO , J. R.; CAMACHO, D. P.; SILVA, B. P. Cultivo de *pleurotus pulmonarius* em óleo vegetal residual de uma indústria alimentícia de Maringá-PR. **Uningá Review**
- GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, S. V.; SANNIA, G. (2010). Laccases: a never-ending story. **Cell. Mol. Sife Sci.** v.67, p. 369-385, 2010. doi:10.1007 / s00018-009-0169-1
- GOMEZ, F.; SARTAJ, M. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 103-109, 2014. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.01.010
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**v.177, p. 751-766, 1949. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/177/2/751.short>> Acesso em 15 de outubro de 2018.
- GRIESBACH, H. Weitere untersuchungen u̇ber azofarbstoffe behufs tinction menschlicher und thierischer gewebe [Further studies of azo dyestuffs as a stain of human and animal tissues]. *Zeitschrift fu̇r Wissenschaftliche Mikroskopie und fu̇r Mikroskopische Technik*.3:358–385. 1886.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-77, 2000.
- GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul**. 2ª ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 124p. 1999.
- GUGLIOTTA, A.M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: Bononi, V.L.R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, Instituto de Botânica, São Paulo, p.184, 1998.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 5 ed. p. 736, 1982.
- HERNÁNDEZ, C. A. et al. Light-induced inhibition of laccase in *Pycnoporus sanguineus*. **Folia Microbiologica**, v. 61, p. 137-142, 2016. doi: 10.1007 / s12223-015-0418-7.
- HUMMEL, J. J.; KNECHT, E. DYEING. In: Chisholm H, Hooper FH, eds. *The Encyclopaedia Britannica*. 11th ed. New York, NY: Encyclopaedia Britannica; p.744–755. 1910

- IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering and Science*, v. 3, p.1-19, 2004. doi: 10.1139/s03-077
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, jul-ago. 2007.
- JALIFE-JACOBO, H.; FERIA-REYES, R.; SERRANO-TORRES, O.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; PERALTA-HERNÁNDEZ, J. M. Diazo dye Congo Red degradation using a Boron-doped diamond anode: An experimental study on the effect of supporting electrolytes. **Journal of Hazardous Materials**.v. 319, p. 78-83, 2016. doi: 10.1016 / j.jhazmat.2016.02.056
- JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K.H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme Microb. Technol.** v.52, p.1-12, 2013. doi: 10.1016 / j.enzmictec.2012.10.003
- KHOUNI, I.; MARROT, B.; MOULIN, P.; AMAR, R.B. Decolourization of the reconstituted textile effluent by different processes treatments: Enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. *Desalination*, 2011, 268: 27-37. doi : 10.1016/j.desal.2010.09.046
- KUBICEK, C. P. **Fungi and Lignocellulosic Biomass**. John Wiley & Sons, 2012.
- KUMAR, J.A.; SING, B.; PETER, C. Biomass power cost and optimum plant size in western. **Biomass Bioenerg.** v.24, p.445-464, 2003. doi: 10.1016/S0961-9534(02)00149-6
- LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y.-S., KIM, M.-J., LEE, J., LEE, H.; HONG, H.-J.; LEE, Y.M.; KIM, G.-H.; KIM, J.-J. (2014). Procedimentos biotecnológicos para seleção de fungos da podridão branca na degradação de HPAs. **Journal of Microbiological Methods**, v.97,p. 56-6, 2014.. doi: 10.1016 / j.mimet.2013.12.007
- LENARTOVICZ, V.; DE SOUZA, C.G.M.; MOREIRA, F.G.; PERALTA, R.M. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.** v.38: 1775-1780. 2003. doi: 10.1016 / S0032-9592 (02) 00261-3
- LOMASCOLO, A.; UZAN-BOUKHRIS, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; SIGOILLOT, J.; LESAGE-MEESSEN, C. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in

biotechnology. **Appl. Microbiol Biotechnol.** v.92:1129–1149, 2011. doi: 10.1007 / s00253-011-3596-5

LORENZO, V. Biodegradation and Bioremediation: An Introduction. In: Steffan R. (eds) **Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.** Springer, Cham. p.1-21, 2018. doi: 10.1007 / 978-3-319-44535-9_1-1

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; RODRIGUES, T. A.; BONONI, V. L. R. Enhancement of growth of *Lentinus crinitus* in soil using benomyl and vegetable oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.425-427, 2006.b

MACHADO, K.M.G.; COMPART, L.C.A.; MORAIS, R.O.; ROSA, L.H.; SANTOS, M.H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 481-487, July/Aug. 2006.a doi: 10.1590 / s1517-83822006000400015

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; MONTEIRO, R.T.R.; BONONI, V.L.R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 297-301, 2005. doi:10.1007/s11274-004-3693-z

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol Technol.** v.47, 693-702, 2004.

MANAVALAN, T; MANAVALAN, A; HEESE, K.Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi.Curr Microbiol. v. 70, p. 485–98, 2015.doi: 10.1007 / s00284-014-0743-0.

MARTÍNEZ SUÁREZ, J. F. Comportamiento electroquímico de colorantes antraquinónicos, azul de metileno, y compuestos afines en solución de solventes noacuosa. 2017. 324 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doctorado En Ciencias Exactas, Área Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, 2017.

MARTÍNKOVÁ, L.; KOTIK, M.; MARKOVÁ, E.; HOMOLKA, L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373-382, 2016. doi: 10.1016 / j.chemosphere.2016.01.022

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**. v.10, n.6, p. 1457-1467, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12422/epdf>>. Acesso em 10 dez. 2018.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. & MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n. 16, v.5, p. 415-421, 2000. doi: 10.1023/A:1008910128114

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p, 1998.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. Department of Soils, West Virginia University, Morgantown, September, 1921. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/49/1/183.full.pdf>> Acesso em 15 de outubro de 2018.

MELO, G. G.; BRAZ, L.C.C.; AMADOR, V.C.; DIAS, E.C.; ALMEIDA, É.S.; SILVA, D.P.; BEZERRA, R.M.; COELHO, G.D. Estudos preliminares sobre a atividade adsortiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus*. **Revista Saúde e Ciência On line**. v. 3, n.3,p. 312-320, set-dez, 2014

MENEGHEL, L.; REIS, G. P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochem*. v.49, n.11, p.1800-1807, 2014.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A.R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM Santa Maria. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.19, n.2, p.1365-1391, 2015. Disponível em: <[file:///C:/Users/Alice/Desktop/Downloads/16853-87537-1-PB%20\(17\).pdf](file:///C:/Users/Alice/Desktop/Downloads/16853-87537-1-PB%20(17).pdf)>

MORAES, S. G.; FREIRE, R. S. DURÁN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonization processes. *Chemosphere*. Vol. 40: 369-373. 2000. doi:10.1016/S0045-6535(99)00239-8

MOREIRA - NETO, S L; MUSSATTO, S. I., MACHADO, K. M. G.; MILAGRES, A. M. F. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. p.283–290, 2013. doi:10.1111/lam.12049

MOREIRA-NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. 124 f . 2006. Dissertação (Mestre em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) Instituto de Botânica, São Paulo. 2006.

MUTECA, F. L. L.; Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola. 72 f. 2012. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

NCBI- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Congo red**. 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Congo_red#section=Top> Acesso em 10 nov. 2018.

NIEBISCH, C. H. **Biodegradação do corante têxtil remazol azul por *Lentinus crinitus*, *Lepista sordida* e *Hydnopolyporus fimbriatus***. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NIEBISCH, C. H. **Caracterização de extratos solúveis com atividade descorante provenientes de dois fungos lignolíticos e determinação da estrutura primária parcial de um dos genes relacionados**. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímicas) - Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2013.

NIEBISCH, C. H.; FOLTRAN, C.; SERRA DOMINGUES, R. C.; PABA, J. Assessment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 20-28, 2014.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. A.; KAVACORDEIRO, V, PABA, J. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**. v. 180, p. 316-322, 2010. doi: 10.1016 / j.jhazmat.2010.04.033

NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production

- and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36, n.1, p. 1545–1551, 2004. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.019
- OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.16, p.889-893, 2000. doi:10.1023/A:100898361
- OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. Produção de celulases por *Aspergillus fumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por extração micelar em duas fases aquosas. 144 f. 2018. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2018.
- OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substrato. 103 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- ORZECOWSKI, J.; RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M.L.L.; BONATTI-CHAVES, M.; FURLAN, S.A. Avaliação do potencial de descoloração e de detoxificação de corantes têxteis por lacase de *Pleurotus sajor-caju*. *Evidência - Ciência e Biotecnologia*. 18. 59. 2018 DOI 10.18593/eba.v18i1.16443.
- OSMA, J. F.; MOILANEN, U.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. **FEMS Microbiol Lett**. p. 318: 27-34. 2011.
- PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI, N. I.; LAPKO, A.G. Purification and Characteristics of an Enzyme with Both Bilirubin Oxidase and Laccase Activities from Mycelium of the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 9, p. 1027-1034, 2009.
- PANDA, S.K.; MISHRA, S.S.; KAYITESI, E.; RAY, R.C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental research**, v. 146, p.161-172, 2016. doi: 10.1016/j.envres.2015.12.035
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D.: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem*. v.35, p.1153–1169, 2000.doi: 10.1016/S0032-9592(00)00152-7

- PANESAR, P.S.; KAUR, R.; SINGLA, G.; SANGWAN, R.S. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl Food Biotechnol**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016. ISSN: 2423-4214
- PEREIRA, W. P.; MELO FILHO, P. A.; ALBUQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; SANTOS, R. C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.766-773, 2012. ISSN 1806-6690
- PEREIRA, W. S.; FREIRE, R. S. Ferro zero: uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 130-136, 2005.
- PEZZELLA, C.; GUARINO, L; PISCITELLI, A. How to enjoy laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p.923-940, 2015. doi: 10.1007 / s00018-014-1823-9.
- PINAZO BELTRÁN, K. F. P. Determinación de la eficacia de biomasa de *Cladophora* sp. en la biosorción de azul de metileno. 2015. 91f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biologia) – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, 2015.
- PROVIDENTI, M. A.; LEE, H. E.; TREVORS, J. T.; Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds. *Journal of industrial Microbiology*, **12**: 379-395, 1993.
- QUEIROZ, M. T. A. *et al.* **Produção mais limpa**: fenton homogêneo no tratamento de efluentes têxteis. VIII SEGeT – Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, [S.l.], 2011.
- RAMPINELLI, J. R. **Utilização de casca de banana para a produção de lacase por *pleurotus sajour-caju* ccb 019**. 132f. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis, 2016.
- REIS, L. G. T. Degradação do corante vermelho congo em solução aquosa através de plasma obtido por eletrólise de alta tensão. 2009. 114f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.
- RENGE, V. C.; KHEDKAR, S. V.; NANDURKAR, N. R. Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review. **Sci. Revs. Chem. Commun.** v.2, n.4, p. 585-590, 2012. ISSN 2277-2669

- RODRIGUES, K.; SILVA, K. M. L.; SILVA, G. M. M.; LIMA, P. C. C.; WANDERLEY, C. R. P.; SILVA, G. M. Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1119-1123, 2011. doi:10.1590/s0100-40422011000700003
- SACCHETO, J. P. Otimização da produção da lacase por *Botryospheria rhodina* MAM-05 em óleo de Soja como única fonte de carbono. 127f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2009.
- SANT'ANA, J.R.; G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA,U.; AQUARONE,E.; BORZANI,W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia e Bioquímica**, v. 2, 1ª ed. São Paulo, UdgardBluche, p.351-356. 2001.
- SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA JÚNIOR, A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Solid-state fermentation in agroindustrial residues for enzymes production: a systematic review. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**. v.4 , n. 2, 2018.
- SANTOS, R.C.; MELO FILHO, P.A.; BRITO, S.F.; MORAES, J.S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos Valência e Virgínia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n.6, p.607-612, 1997.
- SANTOS, T.C.; ROCHA, T.J.O.; OLIVEIRA, A.C.; FILHO, G.A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobromacacao*). **Arq. Inst. Biol.**, v.80, n.1, p.65-71, 2013.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, Biotechnologia industrial, v.2. 2001.
- SCHMIDT, C.; SPEROTTO, R. A.; GRANADA, C. E. Isolamento e Caracterização de uma Bactéria Eficiente na Biodegradação de Corantes Azo Sintéticos. In: ANAIS DO SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 2016, . **Resumos...** Campinas, GALOÁ, 2018.
- SCHULZ, H. Ueber das Congorot als reagens auf freie saure [Concerning Congo red as a reagent for free acids]. *Centralblatt für die Medicinischen Wissenschaften*. p.29-30, 1886
- 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, G. T. e GIBERTONI, T. B. Aphyllophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da região metropolitana de Recife, PE, Brasil. **Hoehnea**, v. 33, n. 4, p. 344- 543, 2006.
- SILVA, M. A. ; SOTERO, K. K. S. ; COELHO, G. D. . Biotechnological potential of the use of green coconut bagasse in the production of lacase by *lentinus crinitus* ccibt2611. In: XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2017, ARACAJU. XXI SINAFERM /XII SHEB, 2017.
- SILVA, R. R. ;COELHO, G. D.. Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. In: Tania Maria Cerati. (Org.). Publicação Didáticas., 2006, Disponível em >http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf>. Acesso em 08 de nov de 2018.
- SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**.Ribeirão Preto: Legis Summa. p. 349-379. 2004.
- SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates).**Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 29, p.173–181, 2015.
- SINGVI, M.; DIGAMBAR, S.C.; GOKHALE, V. Lignocellulose processing: a current challenge. **RSC Adv.** v.4, n.16, p. 8271–8277, 2014. doi: 10.1039 / c3ra46112b
- SOARES, C. H. L. **Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetes degradadores de madeira**. 1998, 133f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.
- SOARES, I. A.; FLORES, A.C.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; BARONI,S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p.341-350, 2011.
- SOARES, J. K. N. C. **Efeito da adição de sacarose e sulfato de cobre na descoloração do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus Crinitus* CCIBt 2611**. 2016. 51 f. Monografia (Bacharel em Engenharia de Biotecnologia) - Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2016.
- SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PEREZ, H. I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolourization of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1723-1748, 2012. doi: 10.1016 / j.procbio.2012.08.014
- SOTERO ,K. K. S. ; SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. A. M.; BALLAMINU, N. COELHO, G. D. AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR

Lentinus crinitus NA PRESENÇA DE SULFATO DE COBRE. In: I Congresso Brasileiro de Engenharia de Biosistemas IV Semana de Engenharia de Biosistemas. Tupã, 2017.

SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. **FEMS Biotechnology Letters**, Holanda, v. 222, n. 1, p. 45-50, 2003. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00220-9

SPONZA, D.T.; IŞIK, M. Toxicity and intermediates of CI Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2735-2744, 2005.

STRONG P.J. E CLAUS H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.411, p. 373-434, 2011.

TAN, L.; ELE, M.; SONG, L.; FU, X.; SHI, S. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 287-294, 2016. doi: 10.1016 / j.biortech.2015.12.058

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. v.72, p.169-183, 2000.

v.26,n.3,p.40-45, Abr/Jun, 2016. ISSN 2178-2571

VALLE, J.S.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SANTANA, T.T.; ALMEIDA, P.H.; PEREIRA, A.M, LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B.; SOCCOL, C.R. Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, n.4, p.8544-8551, 2014doi: 10.4238 / 2014.outubro.20.31

VASCONCELLOS NETO, J. R. T. **Diversidade e seleção de fungos basidiomicetos afiloforóides para a produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

VERG, E.; PLUMPE, G.; SCHULTHEIS, H.; MEILENSTEINE [Milestones]. Leverkusen, Germany: Bayer AG; 1988.

VOISTLÄNDER-TETZNER. CHRONIK DER BASF LUDWIGSHAFEN A. G [Chronicle of BASF Company of Ludwigshafen]. Date of composition unknown: p.259–260. Available from: BASF AG archives. Williams & Wilkins; 1983.

- WANYONYI, W. C.; ONYARI, J. M.; SHIUNDU, P. M. Adsorption of Congo Red Dye from Aqueous Solutions Using Roots of *Eichhornia crassipes*: Kinetic and Equilibrium Studies. **Energy Procedia**. v.50, p.862-869, 2014. doi: 10.1016 / j.egypro.2014.06.105
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 161-187, 2003. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.08.011
- YANG, J. *et al.* Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front. Microbiol.* v.8, 2017.
- YAROLOPOV, A.I.; SKOROBOGAT'KO, O. V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYYER, SD. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 49, p. 257-280, 1994. doi:10.1007/BF02783061
- YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organicwaste valorization: a review. **Sustainability**. V.9, p.2-28, 2017. doi: 10.3390 / su9020224
- ZANONI, M. V., CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência hoje**. v.29, p.61-64, 2001.