



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS**

KAMILA KATIANE SOTERO SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR FUNGO
BASIDIOMICETO COMO PROPOSTA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE
CONTENDO CORANTE AZOICO**

SUMÉ-PB

2019

KAMILA KATIANE SOTERO SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR FUNGO
BASIDIOMICETO COMO PROPOSTA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE
CONTENDO CORANTE AZOICO**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biosistemas 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 Biosistemas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glauciane Danusa Coelho

SUMÉ-PB

2019



S586b Silva, Kamila Katiane Sotero.
Biodegradação do corante vermelho congo por fungo basidiomiceto com proposta de tratamento de efluente contendo corante azoico. / Kamila Katiane Sotero Silva. - 2019.

59 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

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

1. Fungo basidiomiceto. 2. Biorremediação. 3. Enzimas lignolíticas. 3. Lentinus crinitus CCIBt 2611. 4. Corantes sintéticos. 5. Tratamento de efluente. 6. Lacase. 7. Crescimento fúngico - meio líquido. 8. Corante vermelho congo. I. Coelho, Glauciane Danusa. II. Título.

CDU: 632.4(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

KAMILA KATIANE SOTERO SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO POR FUNGO
BASIDIOMICETO COMO PROPOSTA DE TRATAMENTO DE EFLUENTE
CONTENDO CORANTE AZOICO**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biosistemas 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 Biosistemas.

BANCA EXAMINADORA:

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

**Professora Dra. Joelma Sales dos Santos
Examinadora I – UATEC/CDSA/UFCG**

**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Examinador II – UAEB/CDSA/UFCG**

Trabalho aprovado em: 05 de dezembro de 2019.

SUMÉ - PB

*Ao criador de tudo e todos os seres
Ao meu mentor e família espiritual
As minhas mães Vanda Maria e Inês Marinho
Ao meu Pai/Avô Luiz Esperdião Sotero
E a todos que emanaram vibrações positivas a mim,
Dedico.*

“És senhor do teu destino, e ele tem para ti, como ponto de encontro, o infinito.”

Joanna de Ângelis

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, pela oportunidade de encarnar e evoluir espiritualmente e intelectualmente. Ao meu mentor espiritual por nunca me abandonar. A família espiritual que sinto sempre a sua presença e saudade.

Agradeço e dedico toda a minha graduação a Vanda Maria (in memoriam), minha mãe, que teve a paciência do seu jeitinho em me ensinar a ser uma pessoa melhor e sempre buscar o estudo como a única saída para evoluir.

A minha outra mãe/avó Inês Marinho por ter me criado com tanta dedicação e rigidez, ao meu pai/avô Luiz Sotero (in memoriam), por todos os seus mimos e amor incondicional.

A Andreane e André Luiz por ter me proporcionado a amizade e irmandade, mesmo com todas as brigas de infância rs!

A minha querida e tão amada orientadora Glauciane Danusa, que abriu as portas da sua casa e de sua família para me receber de braços abertos e como pertencente da mesma. Grata pelos ensinamentos e por todos os auxílios. Obrigada a Fábio por todos os bons papos e cervejas e aos pequenos anjos Roberto, Pepé e Vitória pelos momentos maravilhosos.

Ao Nubem, essa família que me acolheu de portas abertas: Adriana Meira, Kalina, Vitória, Cosminha, Rita Mércia, Mércia, sr. Ivanildo, Patrícia, Ana Paula e Eudésia.

A Lu, por ter me dado a vida e todos os auxílios necessários na graduação.

A minhas irmãs, Amanda, Júlia e Valentina.

Ao meu Pai, Marcos Sotero.

Ao meu Tio Marcelo Sotero, por todo o apoio.

A Gabe, Wan e Família pelo o auxílio em Recife, grata demais pelas suas amizades e confiança depositada.

A Família Oliveira, em especial Cristiane e Roberto, por me acolher e ajudar no primeiro ano aqui em Sumé.

Ao meu amigo de infância e um dos melhores, Henrique Cavalcante, obrigada por sua companhia e amizade, sua inteligência e seu lado geminiano é encantador haha.

A um dos meus melhores amigos, Marco Antônio, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, sendo meu braço direito e o que topa todas as loucuras, você é a prova viva que as pessoas podem mudar para melhor. Te amo. #partiuusp

A José Carlos (Dudé), por todos os momentos que passamos juntos, pelas nossas conversas e conselhos dados um ao outro, pelas farras e resenhas, obrigada por me mostrar esse cara sensível e dedicado as amizades, te amo!

A Paloma Moreira, por ser uma amiga tão guerreira e batalhadora, que acolhe as pessoas sempre com doçura e paciência, és única e sua voz de neném também kkk, sou grata por nossa amizade, txi amu. E sem contar da sua linda família, Patrícia, Aninha, Tia e Tio hahaha, obrigada a família mais linda do mundo.

A Taliana, por chegar já arrebatando meu coração, por ser doce, paciente, amorosa, cuidadosa e resiliente. És um exemplo de pessoa. Te amo muito, obrigada por está ao meu lado e me suportar, sei que não é fácil.

A Tácia, por toda sua amizade, farras e cachaças, obrigada por me fazer ter um olhar de cuidado diferente com os amigos, saiba que vai conseguir tudo que almeja, te amo.

A Maria Alice, por ser uma das mulheres mais incríveis e merecedoras do mundo, sua amizade e disponibilidade em me ajudar na construção desse tcc foi essencial, és maravilhosa e só tende a brilhar em SP, te amo.

A Andreza Larissa, pelos momentos maravilhosos juntas, pelo ombro amigo para chorar e fofocar da vida alheia, pelos momentos de machistas não passarão, pelo nosso curso de feminista, obrigada, te amo.

A Davi, por seu meu irmão gêmeo e cachaças mais loucas kkk.

A Caio e Laura, a amizade de vocês é única e um exemplo para mim.

Ao grupo “Anormais”, Davi, Rainy, Tácia, Caio, Andreza e Marco, obrigada por todos os desabafos, risadas e encontros.

Ao “Lar doce Lar”, Williane, Taliana, Tácia e Paloma por me aceitarem em sua casa, me fazendo fazer parte de uma família incrível. A Williane por ser tão doce e receptiva comigo.

Ao meu povo da residência universitária pelos momentos de cuidado: Dudé, Marco, Regina, Rainy, Duda, Marcele, Dayanny, Davi, Dany Francis, Geo, Robson, Tamires, Alice e Shirley.

A minhas colegas de quarto na residência: Regina, Rainy, Alice, Duda, Raiana, Dany Francis e Janaina.

Aos meus amigos do curso, em especial: Larissa Fernanda, Dudé, Paloma, Higor Cândido, Danniely Silva, Lucas Manoel e Matheus Cavalcante.

Aos amigos do peito: Soheila, Thayse, Alberi, Aninha e Patrícia.

Ao Laboratório de Microbiologia, um espaço que me proporcionou inúmeros trabalhos e ensinamentos, me proporcionando tudo que sei. E a equipe do Laboratório, que se tornou uma família.

A Giovana Tommaso, pela oportunidade de estagiar na USP e conhecer um outro universo de possibilidades, obrigada pela receptividade.

Aos meus queridos professores por me darem uma base de conhecimentos necessários para trilhar inúmeros caminhos: Tatiana, Aldinete, Joelma, Fabiana, Morgana, Glauciane, George Ribeiro, Paulo Medeiros, José George, Janduy, Adriano, Bruno, Jean e Hugo.

A GAE, em especial, Tanielzy, Rogério, Rivaldo e Laís, pelo apoio e cuidado em todos esses anos.

Ao Evangelho todas as quartas-feiras na central dos professores, pela palavra de Jesus concedida em um ambiente tão cheio de egos. Obrigada Adriano Barros, pela sua mansidão e benevolência, a Glauciane, a Adriana, pelos melhores conselhos e palavras, a Betânia pela simplicidade e humildade nas palavras, e Marco.

Grata as meninas da limpeza, por sempre manterem a universidade limpa para que possamos trabalhar e estudar: Patrícia, Betânia, Socorro e as demais.

A Universidade Federal de Campina Grande por me tornar engenheira, sempre carregarei teu nome com orgulho para onde quer que eu vá. A minha unidade acadêmica UATEC, em especial a Enéas.

Obrigada as pessoas que não estão citadas aqui, mas, contribuíram de alguma forma.

Obrigada!!!

RESUMO

O despejo de corantes sem tratamento prévio dos efluentes, provoca alteração nos recursos naturais apresentando alto potencial mutagênico e carcinogênico. Dessa forma, o uso de basidiomicetos para a remoção desses compostos dos efluentes contendo corantes tem se mostrado eficiente em tratamentos de biorremediação, devido ao fato destes produzirem enzimas ligninolíticas extracelulares. O isolado fúngico *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 é reconhecido pela capacidade de degradar poluentes orgânicos, assim este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do corante Vermelho Congo (CI Direct Red 28) pelo fungo *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 por meio da adição de sulfato de cobre, um mediador da enzima lacase, e sacarose. O inóculo foi feito em meio MEA (2%) a 30°C. Para avaliação da descoloração foram usados 100 mL de caldo de batata 200 g.L⁻¹, previamente autoclavado e distribuído em frascos de Erlenmeyer, contendo sulfato de cobre, corante e/ou sacarose conforme determinado pelo planejamento fatorial. A quantia de 10 discos de meio de cultura MEA, contendo o fungo previamente crescido, foram adicionados como inóculo. O cultivo foi interrompido com 24 h, 48 h e 72 h por meio de filtração a vácuo utilizando papel filtro. O filtrado foi utilizado para a avaliação da produção de lacase, descoloração do meio por *L. crinitus* e aferição do pH. A biomassa retida no papel filtro foi utilizada para a determinação da massa seca. Para a ampliação do sistema de degradação utilizou 1,4 L de caldo de batata esterilizado, por via úmida, como inóculo utilizou-se o fungo imobilizado em fibra de sisal, com adição da concentração de 40 mg.L⁻¹ de corante VC, 1 mM de CuSO₄ e 2,5% de sacarose, que foram determinadas na primeira etapa da pesquisa, de acordo com o melhor resultado do planejamento fatorial. A maior produção de lacase, bem como descoloração do corante sugeridos pelo planejamento fatorial foi de 7,5 U.L⁻¹ de produção de lacase no ensaio 5, às 72 h contendo 20 mg.L⁻¹ de corante e 5% de sacarose e 51,3 % de descoloração no ensaio 9, às 48 h de cultivo contendo 40 mg.L⁻¹ de corante, 1mM de CuSO₄ e 2,5% de sacarose. Na ampliação do sistema de descoloração verificou-se que os resultados obtidos demonstraram que a adição de sulfato de cobre e de sacarose ao sistema de degradação favorecem o aumento da tolerância do fungo *L. crinitus* a concentrações mais altas do corante.

Palavras-chave: Biorremediação. Lacases. *Lentinus crinitus*. Enzimas Ligninolíticas.

BIODEGRADATION OF THE CONGO RED DYE BY BASIDIOMYCET FUNGUS AS A PROPOSAL FOR THE TREATMENT OF EFFLUENT CONTAINING AZO DYE

ABSTRACT

The disposal of dyes without prior treatment of effluents causes changes in natural resources with high mutagenic and carcinogenic potential. Thus, the use of basidiomycetes to remove these compounds from effluents containing dyes has been shown to be efficient in bioremediation treatments, due to the fact that they produce extracellular ligninolytic enzymes. The fungal isolate *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 is recognized for its ability to degrade organic pollutants, so this study aimed to evaluate the degradation of the Congo Red dye (CI Direct Red 28) by the fungus *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 by adding copper sulfate, a lacase enzyme mediator, and sucrose. The inoculum was performed in MEA medium (2%) at 30°C. For evaluation of discoloration, 100 mL of previously autoclaved 200 g.L⁻¹ potato broth was used and distributed in Erlenmeyer bottles containing copper sulfate, dye and/or sucrose as determined by factor planning. The amount of 10 discs of MEA culture medium, containing the previously grown fungus, were added as inoculum. The culture was interrupted at 24 h, 48 h and 72 h by means of vacuum filtration using filter paper. The filtrate was used for the evaluation of lacase production, media discoloration by *L. crinitus* and pH measurement. The biomass retained in the filter paper was used to determine the dry mass. For the expansion of the degradation system, 1.4 L of sterilized potato broth was used in a wet way, as inoculum the immobilized fungus in sisal fiber was used, with addition of the concentration of 40 mg.L⁻¹ of VC dye, 1 mM of CuSO₄ and 2.5% of sucrose, which were determined in the first stage of the research, according to the best result of factor planning. The highest lacase production and dye discoloration suggested by factor planning was 7.5 U.L⁻¹ of lacase production in assay 5, at 72 hours containing 20 mg.L⁻¹ of dye and 5% of sucrose and 51.3% of discoloration in assay 9, at 48 hours of cultivation containing 40 mg.L⁻¹ of dye, 1mM of CuSO₄ and 2.5% of sucrose. In the expansion of the discoloration system, it was found that the results obtained showed that the addition of copper sulfate and sucrose to the degradation system favoured an increase in the tolerance of the fungus *L. crinitus* to higher concentrations of the dye.

Keywords: Bioremediation. Laccases. *Lentinus crinitus*. Ligninolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do corante contendo grupo diazo como grupo cromóforo	22
Figura 2 - Meio líquido em Erlenmeyers para avaliação da degradação do corante CI Direct Red 28 (Vermelho Congo) contendo o inóculo.....	26
Figura 3 - Filtração a vácuo (A) obtenção do filtrado (B).....	28
Figura 4 - Determinação da atividade da lacase por meio do espectrofotômetro (modelo Instrutherm UV – 1000A).....	29
Figura 5 - Aplicação do sisal no meio de cultura BDA (A) Aplicação do inóculo fúngico no sisal em forma de espiral (B) Aplicação do inóculo fúngico no sisal em forma de tiras (C)...	30
Figura 6 - Aplicação do VC no meio líquido contendo 1400 mL (A) Fungo imobilizado no sisal sendo aplicado no meio líquido com um suporte de madeira (B)(C).....	31
Figura 7 - Ensaio 1: Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 20 mg.L ⁻¹ , biomassa e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611, sem adição de sulfato de cobre e sacarose.....	32
Figura 8 - Ensaio 2: Cinética da atividade de lacase, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 60 mg.L ⁻¹ , biomassa e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611, sem adição sulfato de cobre como indutor enzimático e sacarose	33
Figura 9 - Ensaio 3: Perfil da atividade enzimática, descoloração, biomassa e pH referente ao cultivo do fungo na presença do corante na concentração de 20 mg.L ⁻¹ com 2mM de sulfato de cobre	34
Figura 10 - Ensaio 4: Perfil de atividade enzimática (Lacase), biomassa, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 60 mg.L ⁻¹ e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> , com adição de sulfato de cobre a 2mM	35
Figura 11 - Ensaio 5: Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante vermelho Congo, biomassa e pH na concentração de 20 mg.L ⁻¹ , referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611, com adição de sacarose a 5%	36
Figura 12 - Visualização do crescimento fúngico no ensaio 5.....	37
Figura 13 - Ensaio 6: Cinética de produção de lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 60 mg.L ⁻¹ , crescimento fúngico e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611 com adição de 5% de sacarose	37
Figura 14 - Ensaio 7: Perfil de atividade enzimática, biomassa, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 20 mg.L ⁻¹ e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> , com adição de 2 mM de sulfato de cobre 5% de sacarose	38

Figura 15 - Ensaio 8: Perfil da atividade da lacase, biomassa, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 60 mg.L ⁻¹ e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> , com adição de 2 mM de sulfato de cobre 5% de sacarose.....	39
Figura 16 - Ensaio 9: Perfil da atividade de lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 40 mg.L ⁻¹ , crescimento fúngico e pH referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611, com adição de 1 mM sulfato de cobre CuSO ₄ e 2,5% sacarose.....	40
Figura 17 - Análise comparativa do percentual de descoloração referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9.....	41
Figura 18 - Gráfico de Superfície de Resposta do efeito da descoloração (A) Diagrama de Pareto sob influência da descoloração (B)	42
Figura 19 - Análise comparativa da biomassa fúngica referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9.....	43
Figura 20 - Gráfico de Superfície de Resposta em relação a biomassa fúngica (A) Diagrama de Pareto sobre efeito da biomassa (B)	44
Figura 21 - Análise comparativa da produção da enzima lacase referente ao cultivo do fungo <i>L. crinitus</i> na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9.....	45
Figura 22 - Superfície de resposta: efeito sobre a atividade de lacase (A) Diagrama de Pareto: efeito sobre a atividade da lacase (B)	46
Figura 23 - Crescimento do fungo imobilizado sisal durante os 29 dias	47
Figura 24 - Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante VC e pH na concentração de 40 mg.L ⁻¹ , na ampliação de escala referente ao cultivo do fungo <i>Lentinus crinitus</i> CCIBT 2611, 1mM sulfato de cobre e 2,5% de sacarose.....	48
Figura 25 - Primeiro dia de incubação do ensaio de ampliação de escala	49
Figura 26 - Último dia de incubação do ensaio de ampliação de escala	49
Figura 27 - Biomassa do ensaio de ampliação de escala no último dia de incubação	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura MEA para ativação do fungo.....	25
Tabela 2 - Níveis do planejamento experimental	27
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental	27
Tabela 4 - Concentrações da mistura de reação para determinação da atividade enzimática .	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2' –azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico
BDA	Batata Dextrose Agar
CCIBt	Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
mL	miliLitro
mM	miliMolar
MEA	Ágar Extrato de Malte
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
VC	Vermelho Congo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS POR CORANTES.....	19
3.2	CORANTES SINTÉTICOS	20
3.2.1	Corantes azoicos.....	21
3.2.2	Vermelho Congo	21
3.3	BIORREMEDIAÇÃO	22
3.4	FUNGOS BASIDIOMICETOS.....	23
3.4.1	<i>Lentinus crinitus</i>.....	24
3.5	LACASE.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MICROORGANISMO USADO	25
4.2	CORANTE	26
4.3	INÓCULO	26
4.4	MEIO LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO.....	26
4.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL	27
4.6	OBTENÇÃO DO FILTRADO	27
4.7	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO LÍQUIDO	28
4.8	DESCOLORAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO	29
4.9	CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO	29
4.10	AMPLIAÇÃO DE ESCALA.....	30
4.11	ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
5	RESULTADOS	31

5.1	RESULTADOS PROPOSTOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL	30
5.2	RESULTADOS DA AMPLIAÇÃO DE ESCALA	46
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS	521

1 INTRODUÇÃO

O descarte inadequado de substâncias tóxicas, como os corantes, é um problema que vem despertando o interesse pela busca de tecnologias para diminuir ou até mesmo eliminar a toxicidade dessas substâncias, que quando liberados no ambiente, podem causar danos aos ecossistemas e à saúde humana (KHOUNI et al., 2011). Nesse sentido, a biorremediação tem se mostrado interessante para a remoção desses corantes dos efluentes, por apresentar baixo custo associado à diminuição da toxicidade. Entre os organismos utilizados na biorremediação, os fungos basidiomicetos destacam-se por produzir um mecanismo ligninolítico capaz de degradar compostos orgânicos, tais como organoclorados e corantes (MOREIRA-NETO et al., 2011; 2013).

O fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBt2611 é reconhecido por degradar poluentes orgânicos (MATHEUS et al., 2000; BALLAMINUT et al., 2014), e corantes sintéticos como o Vermelho Congo (CI Direct Red 28) (SOARES, 2016). No entanto, sabe-se que esse fungo é incapaz de sobreviver a altas concentrações desse corante (SILVA, 2015).

O fungo *L. crinitus* também é capaz de produzir a enzima lignolítica lacase tanto nos cultivos líquidos estáticos quanto sob agitação (NEPOMUCENA, 2010). Sendo a lacase uma enzima com potencial de descoloração de corantes sintéticos (RODAK; PAULISTA, 2017; MEHANDIA; SHARMA; ARYA, 2019)

Assim, a avaliação da tolerância e da biodegradação de altas concentrações de vermelho congo por *L. crinitus* foi avaliada partir de sistemas *in vivo* com a adição de sacarose, e sulfato de cobre em um planejamento fatorial 2³, com triplicata no ponto central. A melhor condição determinada pelo planejamento fatorial foi aplicada para a ampliação de escala, visando contribuir para o desenvolvimento de técnica de biorremediação utilizando esse fungo, bem como para melhorar o entendimento da fisiologia desse microrganismo em situação de estresse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de aplicação do basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIBT 2611 *in vivo* para biodegradação do corante Vermelho Congo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da concentração do corante Vermelho Congo, sulfato de cobre e sacarose usando um planejamento fatorial, sobre a degradação do referido corante, no crescimento fúngico e na produção de lacase;
- Ampliar a escala de aplicação de *L. crinitus* na biodegradação do Vermelho Congo, utilizando a melhor condição indicada pelo planejamento fatorial.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS POR CORANTES

A poluição dos recursos hídricos é umas das grandes preocupações atuais, pois independentemente do tipo de degradação, esta causa prejuízos a organismos, plantas e ao consumo humano (EOS, 2019). Leis e regulamentos são feitos para superar esses problemas e monitorar a descarga de poluição nos recursos hídricos, como os rios, essas medidas legais por si só não são muito bem-sucedidas em deter a crescente poluição dos recursos hídricos (AMIRI; MAZAHERI; MOHAMMAD VALI SAMANI, 2019).

Nos últimos anos no Brasil, a legislação tornou-se mais rigorosa quanto ao tratamento de efluentes lançados em corpos aquáticos. De acordo com a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), todos efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após passarem pelo devido tratamento e desde que correspondam às condições, aos padrões e às exigências propostos pelo órgão regulamentador. O CONAMA ainda estabelece que a descarga deste tipo de resíduo não pode provocar coloração no corpo receptor (PEREIRA; FREITAS, 2012).

A poluição dos recursos hídricos e os problemas de deterioração ecológica podem, sem dúvida, impedir o crescimento socioeconômico. A eutrofização é um processo que afeta seriamente os ecossistemas aquáticos em lagos, rios e córregos, ameaçando a segurança das fontes de água potável e levando à formação de zonas anóxicas em lagos, rios e mares. Portanto, é desejável que estratégias efetivas de planejamento de recursos hídricos e controle de poluição sejam adotadas para facilitar o desenvolvimento sustentável (ZHANG et al., 2019; ZHANG et al., 2015; LIU et al., 2017; LOECKE et al., 2017).

Outro problema gerado pela poluição dos recursos hídricos são os efeitos que substâncias, como os corantes, podem provocar a saúde humana quando liberadas no meio ambiente. Tais resíduos acumulam-se nos organismos vivos atingindo desta forma a cadeia alimentar. A principal preocupação é o poder mutagênico e carcinogênico que estas substâncias

possuem, e outros efeitos causados ao entrarem nos organismos não são conhecidos completamente (DELLAMATRICE, 2006).

O despejo de efluente coloridos não tratado nos recursos hídricos pode ocasionar uma redução acentuada da riqueza taxonômica geral (COLIN et al., 2016), contaminar as águas subterrâneas, os corpos d'água e reduzir o oxigênio dissolvido na água (HOSSAIN; SARKER; KHAN, 2018). A poluição da água com corante é claramente visível e evita a penetração da luz na água, o que interfere diretamente na sobrevivência de organismos aquáticos (CHEN et al., 2003).

A poluição causada por corantes pode permanecer nos sedimentos dos rios por anos, mesmo que a descarga de águas residuais possa ter cessado e a água do rio possa parecer limpa. Durante a degradação do corante azo, aminas aromáticas são produzidas e podem se acumular nos sedimentos dos rios. Podendo ser necessários dois ou mais anos para que a comunidade bacteriana dos sedimentos corrija a poluição associada aos corantes têxteis e aminas aromáticas derivadas de corantes, independentemente do grau de poluição (ITO et al., 2016).

3.2 CORANTES SINTÉTICOS

Os corantes sintéticos apresentam uma variedade química com várias aplicações industriais, incluindo têxtil, papel e celulose, farmacêutica e cosmética, entre outras. As taxas mais altas de toxicidade foram encontradas entre os corantes diretos básicos e diazo (ALENCAR et al., 2012). Os corantes conhecidos apresentam diferentes classes químicas, tais como naftóis, enxofre, trifenil metano, nitroso, ftalocianina, reagentes baseados em cloreto cianúrico, azo, antraquinona, stilbene, entre outros. Sendo que os corantes são classificados em reativos, diretos, ácidos, à cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados, branqueadores e azoicos (NIMKAR, 2018).

Quando descartados sem tratamento prévio, os corantes sintéticos tornam-se fonte de poluição visual e de alterações nos ciclos biológicos, causando problemas de saúde aos seres humanos e ao meio ambiente, visto que são criados para serem recalcitrantes (KHOUNI et al., 2011). Por outra via, as pesquisas científicas buscam encontrar microrganismos altamente eficientes para degradar as moléculas dos corantes sintéticos, que são recalcitrantes e com isso garantir a eficácia dos tratamentos biológicos, uma vez que, os estudos concentram-se principalmente na utilização de fungos e bactérias (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016).

3.2.1 Corantes azoicos

Os corantes azo formam um grande grupo de compostos disponíveis desde o século XVIII. Muitos dos compostos azo são praticamente insolúveis e estes são chamados pigmentos. Os pigmentos são amplamente utilizados como corantes em tintas, tecidos, tintas de impressão e cosméticos e são agrupados em vários tipos, dependendo da semelhança na estrutura química. Os pigmentos azo são produzidos por meio de uma reação de diazotização, onde um grupo amino primário reage com nitrito de sódio em ácido clorídrico para formar uma fração de cloreto de diazônio que pode, por um ataque eletrofilico, ser acoplado a compostos ricos em elétrons (como 2 -hidroxinaftaleno) (MØLLER; WALLIN, 2000).

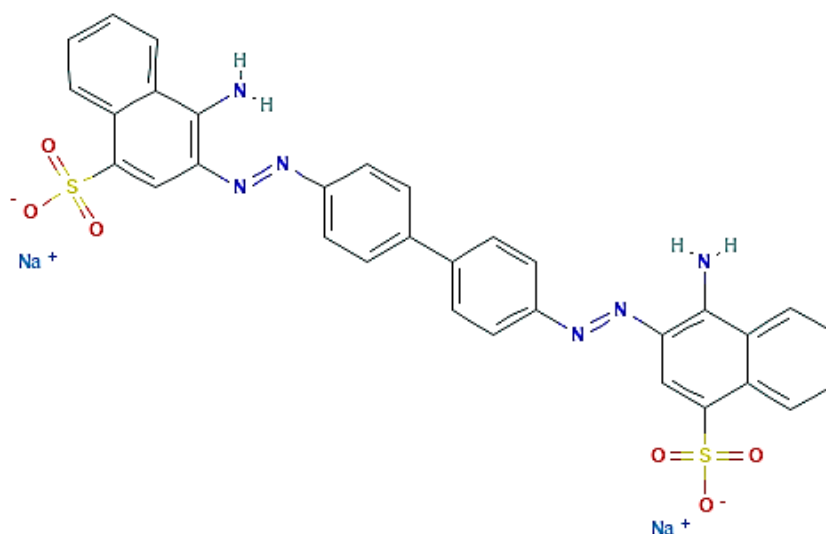
Em torno de 10 a 15%, dos corantes azoicos é liberada como efluente nas correntes abertas, apresentando perigo ecotóxico de efeito acumulativo (PRASAD; RAO, 2013). Os efluentes de corantes possuem uma toxicidade na qual os produtos residuais derivados de benzeno ou aminas aromáticas são provavelmente as substâncias causadoras de toxicidade (XUE et al., 2019).

Segundo Ito et al. (2016) os corantes azo são os mais usados no mercado e reduzem-se em sedimentos anóxicos, formando aminas aromáticas perigosas que permanecem nos sedimentos por vários anos. Sendo que esse grupo de corantes, assim como os seus componentes estão diretamente relacionados a atividade mutagênica de um rio (UMBUZEIRO et al., 2005).

3.2.2 Vermelho Congo

O Vermelho Congo (VC) é um corante azoico, sendo um sal sódico do ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico, de cor vermelha, com temperatura de fusão acima de 360°C, cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, apresentando uma massa molar de 696,66 g.mol⁻¹ e estrutura molecular bastante complexa contendo anéis aromáticos (Figura 1) (NCBI, 2019; REIS, 2009).

Figura 1 - Estrutura química do corante contendo grupo diazo como grupo cromóforo



Fonte: National Center for Biotechnology Information (PUBCHEM, 2019)

O corante VC é classificado como diazo secundário por apresentar dois grupos de ligações estáveis azo (- N = N -) (KHURANA et al., 2001). É um corante solúvel em água, produzindo uma solução coloidal vermelha, possui uma solubilidade melhor com solventes orgânicos como o etanol. Ele tem uma forte afinidade a fibras de celulose, aparentemente não-covalente. Devido à alta toxicidade e papel carcinogênico e mutagênico, além de ser bisazo aniônico à base de benzidina e carcinógeno humano, a indústria de celulose (algodão têxtil e papel) tem abandonado cada vez mais o seu uso. É perigoso para os seres humanos e o meio ambiente (REIS, 2009; SHETTI et al., 2019).

3.3 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma tecnologia biológica que utiliza microrganismos ou plantas com a capacidade de biodegradar compostos recalcitrantes do ambiente. Geralmente é difícil degradar os compostos presentes em águas residuárias da indústria por processos de tratamento biológico convencional. A descoloração de corantes por bactérias pode ser causada por adsorção em células microbianas ou biodegradação. Uma vez que os fungos são considerados mais tolerantes que as bactérias a condições adversas, a aplicação especialmente de fungos basidiomicetos em biorremediação de efluentes apresenta-se como uma técnica viável. Esse processo também pode ser realizado pela ação de enzimas que degradam substâncias tóxicas convertendo-as em substâncias menos ou não tóxicas (DOBLE; KUMAR, 2005; SOARES et al., 2011; DE LORENZO, 2018). Ainda, devido ao modo de crescimento dos fungos por

alongamento e ramificação das hifas, esses organismos alcançam uma colonização de áreas maiores, aumentando assim o contato superficial com o contaminante, melhorando os níveis de biodegradação (BALLAMINUT, 2007).

O desenvolvimento de técnicas de biorremediação empregando fungos basidiomicetos teve início na segunda metade dos anos 70, com a demonstração da capacidade destes fungos de degradar compostos orgânicos tóxicos e persistentes (COMPART, 2004).

A remoção de corantes presentes nos efluentes de maneira eficiente ainda é um dos maiores desafios ambientais devido à grande diversidade dos compostos, bem como alta complexidade das moléculas, surgindo assim, uma grande preocupação para desenvolver processos voltados para o tratamento destes efluentes de forma mais adequada. Em função disso, trabalhos vêm sendo publicados recentemente envolvendo especialmente o emprego de métodos físicos e químicos no tratamento de efluente contendo o corante Vermelho Congo (BHOI et al 2016; LI et al 2016; ASIF et al., 2018; SATHISHKUMAR et al., 2019).

3.4 FUNGOS BASIDIOMICETOS

Os fungos basidiomicetos crescem principalmente sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal, sendo extremamente importantes como decompositores e os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Eles degradam todos os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução (TUOR; WINTERHALTER; FIECHTER, 1995; ARUN; EYINI, 2011; XU; WANG, 2015; LI et al., 2019).

O processo de degradação inicia-se com a liberação de enzimas extracelulares para o meio externo à hifa do fungo, onde irá ocorrer a degradação das moléculas complexas do substrato em moléculas com baixas massas moleculares que serão absorvidas pelo fungo para nutrição (COMPART, 2004).

Com base na capacidade de degradar a lignina junto ou não com a celulose e a hemicelulose, os fungos decompositores da madeira são tradicionalmente divididos em causadores da podridão branca e podridão parda (basidiomicetos), e causadores da podridão mole, causada principalmente por ascomicetes (BALDRIAN, 2003; CHAKRABORTY et al., 2013; NIEBISCH, 2013; PERALTA et al., 2017; PANDI et al., 2019).

Os principais componentes enzimáticos do complexo ligninolítico de fungos basidiomicetos são Lignina Peroxidase, Peroxidase dependente do Manganês e Lacase, sendo que essa última tem recebido o *status* de enzima *ecofriendly* (RODRÍGUEZ-COUTO, 2012; SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016) devido ao potencial de degradação e

redução de toxicidade de diferentes classes de poluentes orgânicos como os corantes têxteis sintéticos (MOREIRA-NETO et al., 2013; ALMEIDA et al., 2018), e organoclorados (PACHECO; SOARES, 2014; COELHO et al., 2019).

Além dos componentes enzimáticos, o complexo ligninolítico de basidiomicetos conta com a participação dos compostos de baixa massa molecular, que podem atuar como mediadores das enzimas oxidativas, viabilizando o acesso dessas ao substrato. Dentre os compostos de baixa massa molecular descritos estão: o ácido 3-hidroxi-antranílico, ácidos carboxílicos, ácidos graxos insaturados, álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico, espécies reativas de oxigênio (ROS) e compostos quelantes e redutores de Fe^{+3} (ARANTES; MILAGRES, 2009; ARANTES et al. 2011).

3.4.1 *Lentinus crinitus*

O fungo *Lentinus crinitus* é reconhecido pela capacidade de produzir a lacase e degradar até a mineralização da lignina (HERNÁNDEZ et al., 2016), poluentes organoclorados como hexaclorobenzeno (MATHEUS et al., 2000) e pentaclorofenol (MACHADO et al., 2006; BALLAMINUT, 2007) e corantes sintéticos (MOREIRA-NETO et al., 2013, BALLAMINUT et al., 2014; BOSCO; MOLLEA; RUGGERI, 2017; ALMEIDA et al., 2018).

L. crinitus é um basidiomiceto muito importante na produção de lacase (SANTANA et al., 2018) e sua produção de biomassa micelial é utilizada para bioacumulação com lítio que pode representar uma alternativa para a produção de alimentos (FARIA et al., 2019).

3.5 LACASE

Dentre as enzimas do complexo ligninolítico destaca-se a lacase, uma enzima multicobre que degrada a lignina e compostos xenobióticos pela abstração de elétrons concomitante à redução de oxigênio a água (STRONG; CLAUS 2011; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016; MAYER; STAPLES, 2002).

A lacase ataca apenas as subunidades fenólicas da lignina, que levam à clivagem. No entanto, diante da adição de mediadores, as lacases tornam-se capazes de degradar estruturas não fenólicas. A catálise de lacase compreende as seguintes etapas: redução do cobre, reduzindo o substrato; transferência interna de elétrons de cobre; redução de oxigênio para água nos locais de cobre. Fazendo com que a lacase tenha uma ampla especificidade e tornando-a de grande interesse em aplicações biotecnológicas (UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL,

2016), tais como tratamento de efluentes, biotransformação de xenobióticos, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados, a produção de bioetanol a clarificação de vinhos e chás, a produção de biossensores e biorrefinaria (PACHECO; SOARES, 2014; LIU et al. 2019; SINGH; ARYA, 2019; CASTROVILLI et al., 2019; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

Algumas lacases conseguem descolorir eficientemente corantes azo de alta massa molecular em condições culturais (PRAMANIK; CHAUDHURI, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 MICRORGANISMO USADO

Para realização das atividades foi utilizado uma estirpe do fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* CCIB2611 cedido pela Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Botânica, IBt, da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 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) e foi selecionado por degradar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno de solo contaminado (MATHEUS et al. 2000; MACHADO et al. 2005). Essa linhagem foi estudada em sistemas de biorremediação e foi citado por outros autores como *Lentinus zeyheri* CCB 274 (MATHEUS et al. 2000; MATHEUS et al., 2003).

A ativação, bem como a manutenção do isolado, foi feito em meio MEA (Ágar Extrato de Malte) (2%) a 30°C, constituído de extrato de malte 2%, peptona 0,1% e ágar 1,5% (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do meio de cultura MEA para ativação do fungo

COMPONENTES	QUANTIDADE
Extrato de Malte	20g
Peptona	1g
Ágar	15g
Água destilada	1L

Fonte: Dados da pesquisa

4.2 CORANTE

O corante utilizado, Vermelho Congo, cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, apresentando uma massa molar de $696,66 \text{ g.mol}^{-1}$. Partiu de solução estoque de concentração $2,5 \text{ g.L}^{-1}$.

4.3 INÓCULO

Como inóculo foram adicionados 10 discos (5mm de diâmetro) de meio de cultura MEA, contendo o fungo previamente crescido, em frascos contendo 100 mL de caldo de batata, em condições assépticas (Figura 2). O fungo foi inoculado dessa maneira por se tratar de um fungo basidiomiceto e que, portanto, não produz esporos nessa fase de desenvolvimento. No controle foi utilizado o mesmo sistema, na ausência do fungo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O cultivo foi interrompido com 24 h, 48 h e 72 h para coleta e análise de dados.

Figura 2 - Meio líquido em Erlenmeyers para avaliação da degradação do corante CI Direct Red 28 (Vermelho Congo) contendo o inóculo



Fonte: Acervo do autor

4.4 MEIO LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO

Para avaliação da descoloração do corante Vermelho Congo em meio líquido foi usado caldo de batata 200 g.L^{-1} , previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e distribuído em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo sacarose nas concentrações de 0, 2,5 e 5%, Sulfato de cobre (CuSO_4) nas concentrações de 0, 1 e 2 mM e corante nas concentrações de 20, 40 e 60 mg.L^{-1} de acordo com o planejamento fatorial.

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL

A degradação do corante Vermelho Congo em meio líquido foi avaliada por meio de um planejamento experimental, com fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central, totalizando nove (9) ensaios. Por meio do planejamento, as variáveis analisadas foram: sacarose e sulfato de cobre, bem como da interação entre estes fatores na degradação do corante Vermelho Congo, na produção de lacase e na tolerância do fungo a altas concentrações de corante. As variáveis e os níveis dos ensaios são mostrados na Tabela 2 e a matriz do planejamento na Tabela 3.

Tabela 2 - Níveis do planejamento experimental

VARIÁVEL	-1	0	+1
Concentração do corante (mg/L)	20	40	60
Concentração do Sulfato de Cobre (mM)	0	1	2
Concentração de Sacarose (%)	0	2,5	5

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental

ENSAIOS	Corante Vermelho Congo (mg.L ⁻¹)	Sulfato de cobre (mM)	Sacarose (%)
1	20 (-1)	- (-1)	- (-1)
2	60 (+1)	- (-1)	- (-1)
3	20 (-1)	2 (+1)	- (-1)
4	60 (+1)	2 (+1)	- (-1)
5	20 (-1)	- (-1)	5 (+1)
6	60 (+1)	- (-1)	5 (+1)
7	20 (-1)	2 (+1)	5 (+1)
8	60 (+1)	2 (+1)	5 (+1)
9	40 (0)	1 (0)	2,5 (0)
9'	40 (0)	1 (0)	2,5 (0)
9''	40 (0)	1 (0)	2,5 (0)

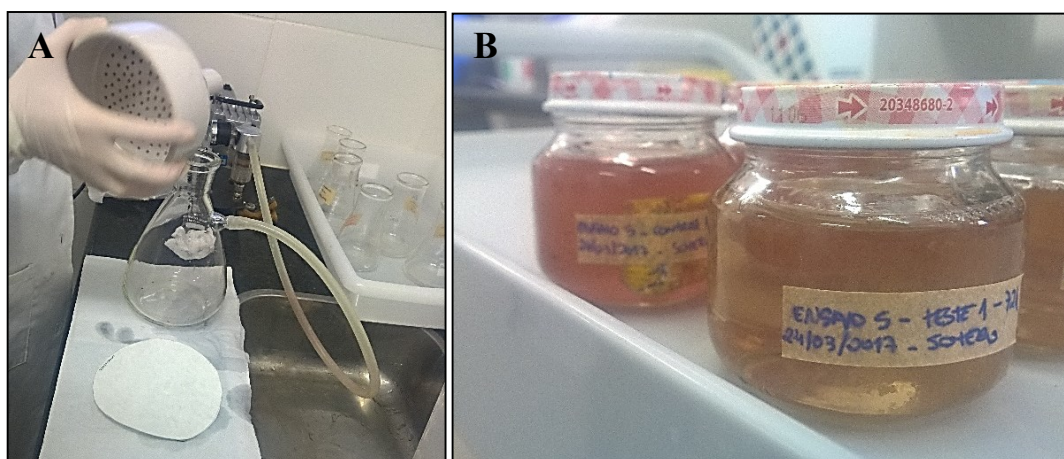
Fonte: Dados da Pesquisa

4.6 OBTENÇÃO DO FILTRADO

O meio líquido foi filtrado a vácuo utilizando papel filtro (Figura 3.A). O filtrado (Figura 3.B) foi utilizado para a avaliação da produção enzimática, bem como, para a avaliação da

descoloração do meio por *L. crinitus* e aferição do pH. A biomassa retida no papel filtro foi utilizada para a determinação da biomassa seca.

Figura 3 - Filtração a vácuo (A) obtenção do filtrado (B)



Fonte: Acervo do Autor

4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MEIO LÍQUIDO

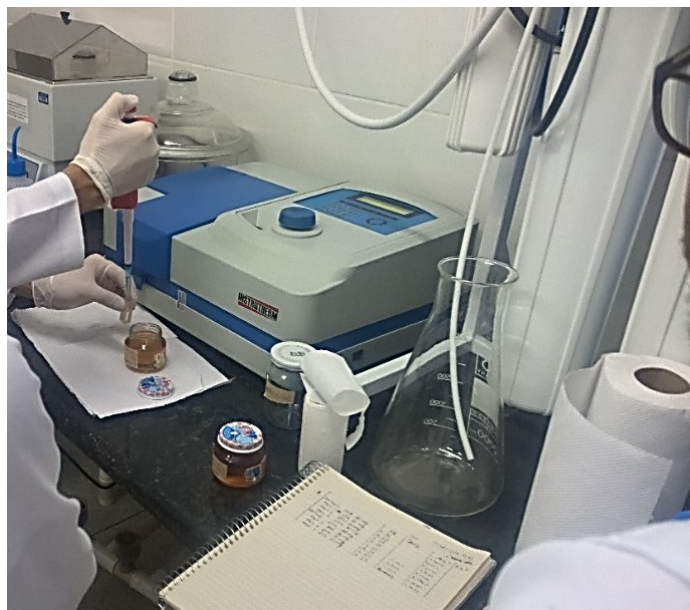
A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) a 420nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 600 segundos, em espectrofotômetro (modelo Instrutherm – 1000A), seguindo o método descrito por Ballaminut (2007). A Figura 4 apresenta momento de determinação da atividade enzimática. A mistura de reação está expressa na Tabela 4. A atividade enzimática foi expressa como unidades internacionais (U) definidas como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de produto por minuto.

Tabela 4 - Concentrações 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: Ballaminut (2007)

Figura 4 - Determinação da atividade da lacase por meio do espectrofotômetro (modelo Instrutherm UV – 1000A)



Fonte: Acervo do autor

4.8 DESCOLORAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO

A leitura da absorbância do filtrado das amostras foi realizada em espectrofotômetro (modelo Instrutherm UV – 1000A), e utilizada para determinar a descoloração em cultura realizada pelo fungo. A porcentagem de descoloração em cultura foi calculada de acordo com a Equação 1 (BRUSCATO, 2011):

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

Sendo que:

A_{amostra} : Absorbância a 340 nm do sobrenadante;

A_{controle} : Absorbância a 340 nm do sobrenadante de culturas sem o inoculo fúngico contendo apenas o corante.

4.9 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO

A determinação do crescimento fúngico em meio líquido foi realizada pela análise da biomassa obtida por filtração, incubou-se em estufa a 50 °C, por 72 horas, em papel filtro seguida de aferição por gravimetria. A biomassa fúngica foi determinada de acordo com a equação 2:

$$X = \frac{\text{Massa}_2 - \text{Massa}_1}{\text{Massa}_2} \quad (2)$$

Sendo que:

X: Valor da Biomassa;

Massa₂: Média do papel filtro com células;

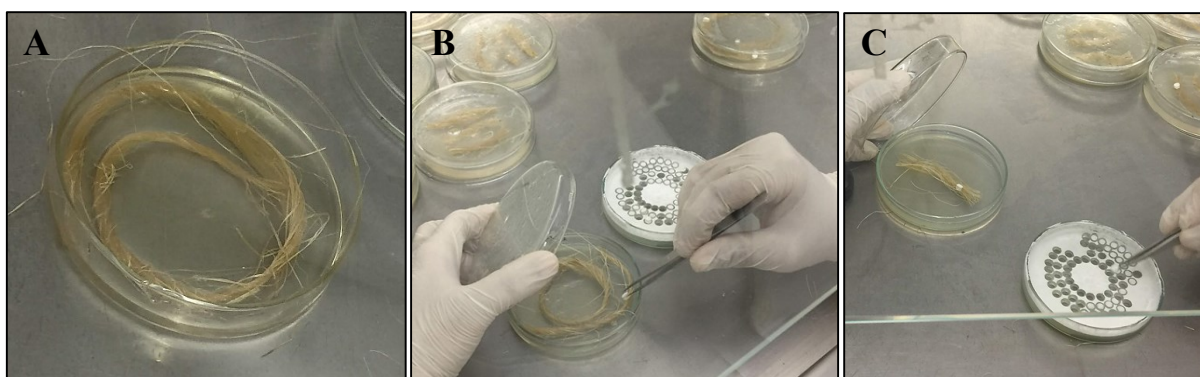
Massa₁: Média do papel filtro sem células.

4.10 AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Com o objetivo de aplicação de tratamento de efluentes de corante Vermelho Congo, este trabalho propôs a ampliação da escala na condição com melhor resultado em relação a descoloração do corante VC, proposto pelo planejamento fatorial. Nesse caso, utilizou-se *L. crinitus* imobilizado em fibra de sisal (*Agave sisalana*), como inóculo, pois trata-se de um material lignocelulósico.

Imobilização do fungo: foi feita em meio BDA (batata-dextrose-agar) constituído de 10g de batata, 10g de dextrose, 10g de ágar em 500mL de água destilada com aplicação do sisal previamente autoclavado por 60 min a 121° C. Após resfriamento, discos de crescimento micelial do fungo foram inoculados nas placas em condições assépticas (Figura 5).

Figura 5 - Aplicação do sisal no meio de cultura BDA (A) Aplicação do inóculo fúngico no sisal em forma de espiral (B) Aplicação do inóculo fúngico no sisal em forma de tiras (C)

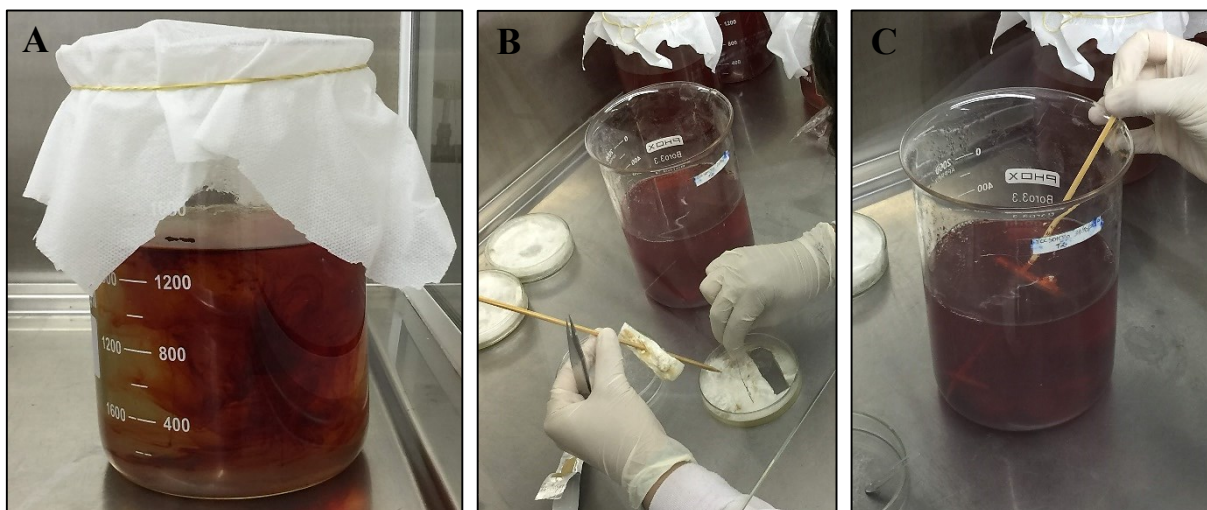


Fonte: Acervo do autor

Meio líquido para avaliação da descoloração: foi constituído de 1,4 L de caldo de batata (200 g.L⁻¹), adicionado de 2,5% de sacarose, 1 mM sulfato de cobre e 40 mg.L⁻¹ de corante Vermelho Congo (Figura 6.A), previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C. O fungo imobilizado no sisal foi adicionado em frascos contendo 1,4 L de caldo de batata, com auxílio de um palito, em condições assépticas (Figura 6.B e C). Como controle foi utilizado o mesmo sistema, na ausência do fungo. O tratamento foi realizado em triplicata. Nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 21 dias o sistema foi homogeneizado sutilmente e alíquotas de 5mL foram

retiradas, centrifugadas e utilizadas para determinação do pH e atividade de lacase conforme o item 4.7 e a descoloração, conforme descrito no item 4.8.

Figura 6 - Aplicação do VC no meio líquido contendo 1400 mL (A) Fungo imobilizado no sisal sendo aplicado no meio líquido com um suporte de madeira (B)(C)



Fonte: Acervo do autor

4.11 ANÁLISE DOS RESULTADOS

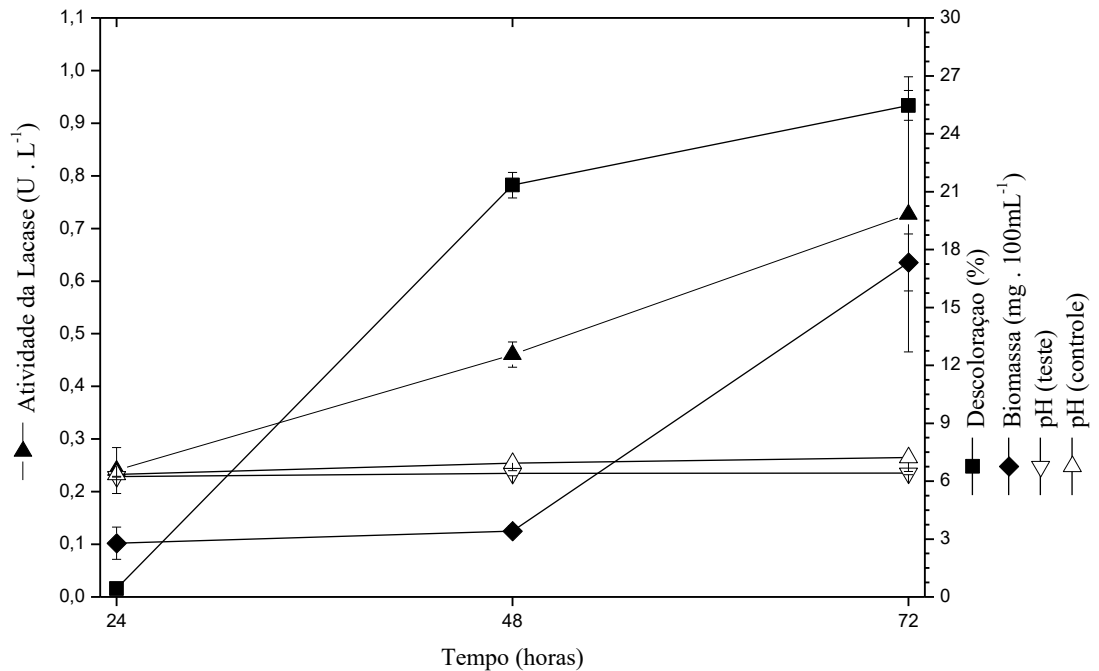
Os resultados foram analisados por meio de gráficos gerados pelos programas computacionais Statistic TM (Versão 8.0, da Statsoft, Inc.) e Origin Pro 8.0.

RESULTADOS

5.1 RESULTADOS PROPOSTOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL

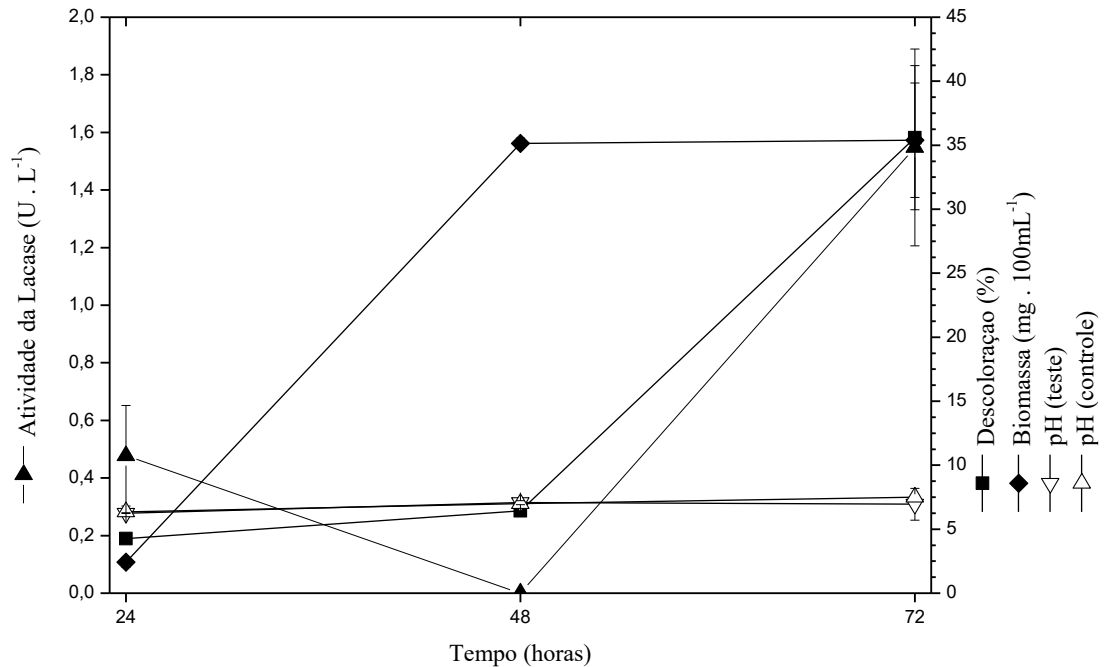
As Figuras de 7 a 22 verifica-se os perfis de produção de lacase ($U.L^{-1}$), degradação do corante Vermelho Congo (%), pH e biomassa ($mg.100mL^{-1}$) nos ensaios de 1 a 9 proposto no planejamento fatorial.

Figura 7 - Ensaio 1: Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 20 mg.L^{-1} , biomassa e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* CCIBT 2611, sem adição de sulfato de cobre e sacarose



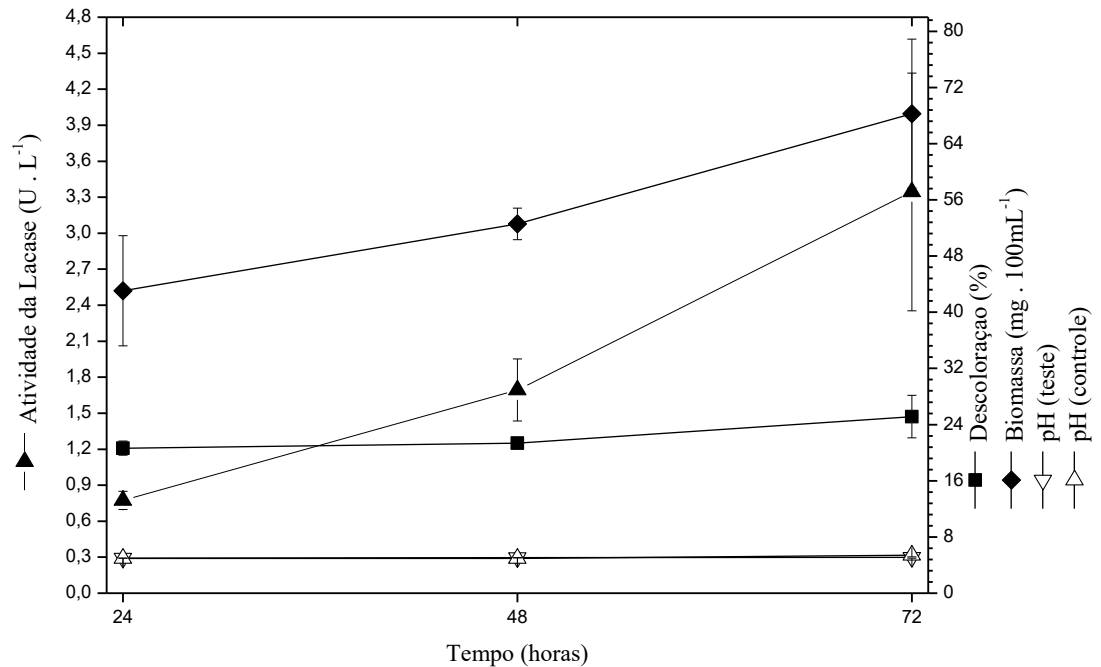
No Ensaio 1 (Figura 7), a partir das 24 horas já é possível observar a ocorrência de atividade de lacase, que se manteve crescente até as 72 horas de incubação, momento em que se verificou o pico de atividade, no valor de $0,73 \text{ U.L}^{-1}$. A descoloração foi verificada a partir de 48h (21,3 %). A máxima descoloração foi de 25,5%, com 72 horas de cultivo. O crescimento fúngico apresentou uma tendência de crescimento entre 48h e 72h de $3,42$ a $17,33 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O pH do teste foi de 6,2 e 6,4 às 24h e 72h de incubação, respectivamente, já o controle apresentou o pH de 6,8 com 72h.

Figura 8 - Ensaio 2: Cinética da atividade de lacase, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 60 mg.L^{-1} , biomassa e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* CCIBT 2611, sem adição sulfato de cobre como indutor enzimático e sacarose



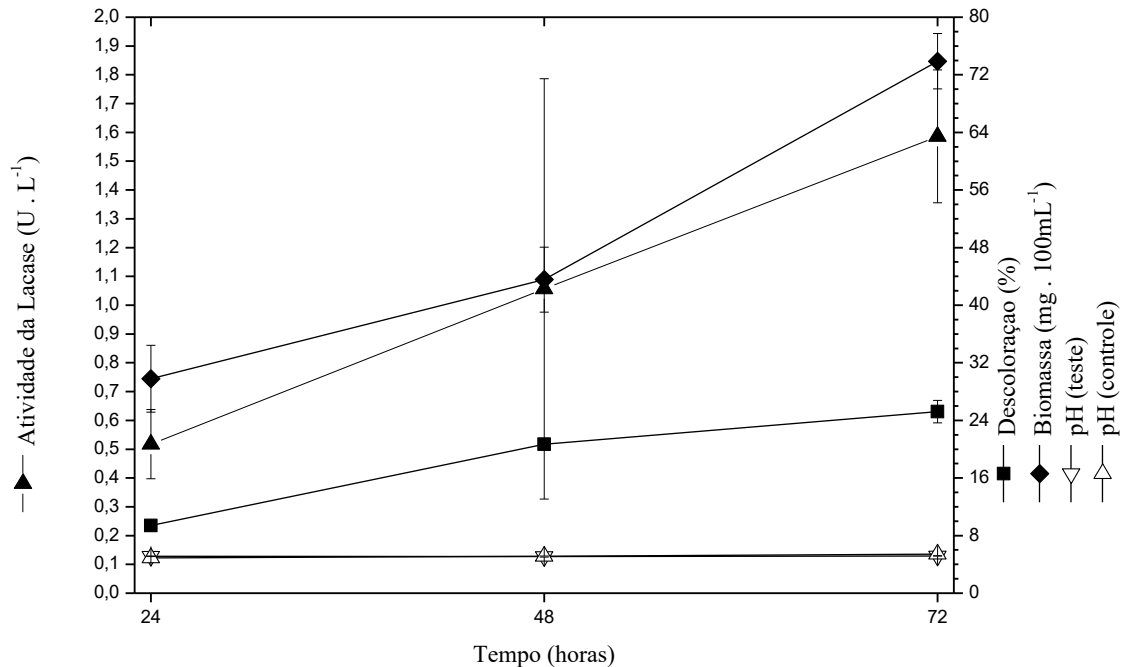
No Ensaio 2 (Figura 8), em uma concentração maior de corante de 60 mg.L^{-1} que o Ensaio 1 de 20 mg.L^{-1} , foi verificado que com 24h de incubação há ocorrência da atividade de lacase ($0,48 \text{ U.L}^{-1}$) e com 72 h de cultivo foi atingido o pico de produção de lacase com $1,55 \text{ U.L}^{-1}$. A descoloração foi verificada nos três intervalos de tempo o aumento gradativo de 4,2, 6,4 e 35,6 %. O fungo teve crescimento exponencial entre 24h e 48 horas, e entre 48h e 72 horas o crescimento manteve-se estável, atingindo 35 mg.100mL^{-1} . Observa-se que o aumento da concentração do corante favoreceu o crescimento fúngico em relação ao Ensaio 1. Os valores de pH no teste é 6,9 com 72h de incubação, e no pH do controle 7,5 as 72h, indicando a acidificação do pH do teste em relação ao controle, tanto no Ensaio 1 como no Ensaio 2.

Figura 9 - Ensaio 3: Perfil da atividade enzimática, descoloração, biomassa e pH referente ao cultivo do fungo na presença do corante na concentração de 20 mg.L^{-1} com 2 mM de sulfato de cobre



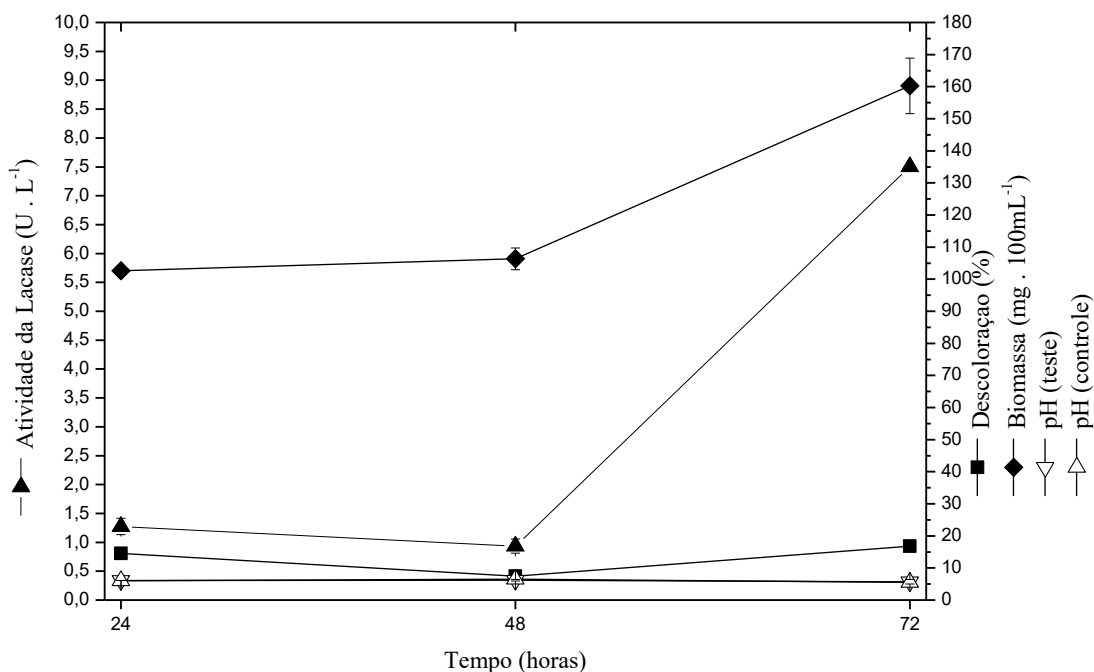
No Ensaio 3 (Figura 9), a partir de 24 horas pode-se observar um aumento da atividade enzimática, chegando ao valor máximo de $3,3 \text{ U.L}^{-1}$ com 72h de incubação. A porcentagem de descoloração variou entre 20,6% e 25,1% no intervalo de tempo avaliado. A biomassa fúngica atingiu valor de $68,27 \text{ mg.100mL}^{-1}$ com 72 horas de cultivo, sugerindo que o sulfato de cobre tenha influenciado no aumento da produção de lacase e no crescimento fúngico em relação ao Ensaio 1, que teve a mesma concentração de corante e não possuía o sulfato de cobre. O pH no teste teve a média de 5,0 nos três intervalos de tempo avaliados, já no pH do controle os valores nos primeiros intervalos de tempo (24 e 48h) foram de 4,9 e de 5,4 as 72h.

Figura 10 - Ensaio 4: Perfil de atividade enzimática (Lacase), biomassa, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 60 mg.L^{-1} e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus*, com adição de sulfato de cobre a 2 mM



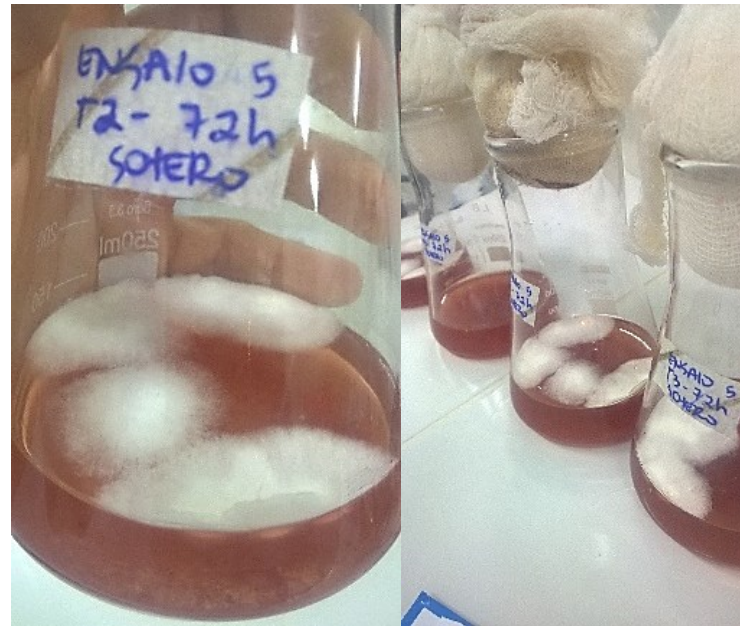
No Ensaio 4 (Figura 10), observa-se a ocorrência da atividade da lacase crescente, com pico de atividade enzimática as 72 horas, atingindo o valor de $1,6 \text{ U.L}^{-1}$. O valor máximo de descoloração foi $25,23\%$ com 72 horas de cultivo. O máximo crescimento fúngico foi com 72 horas no valor de $73,9 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$. O pH do teste passou de 5,1 (24h) para 5,2 (72h), o pH do controle foi crescente até as 72h (4,9, 5,1 e 5,4, respectivamente com 24h, 48h e 72h). Comparando-se os ensaios 2 e 4 (sem e com sulfato de cobre, respectivamente), nota-se a influência positiva do sulfato de cobre sobre o crescimento fúngico.

Figura 11 - Ensaio 5: Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante vermelho Congo, biomassa e pH na concentração de 20 mg.L⁻¹, referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* CCIBT 2611, com adição de sacarose a 5%



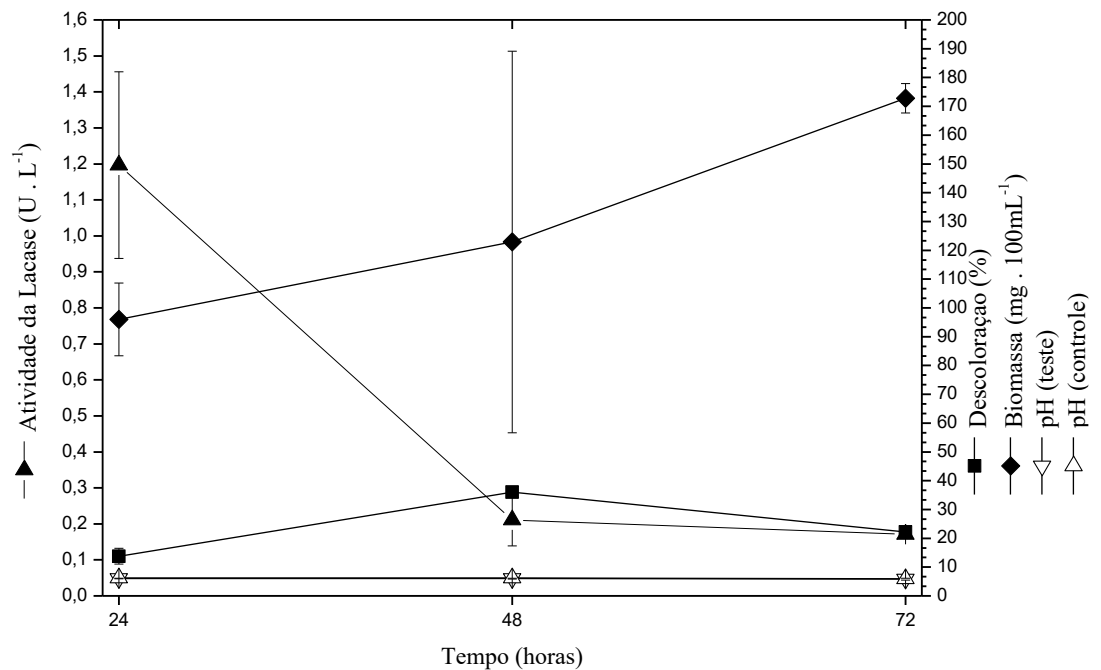
No Ensaio 5 (Figura 11), a atividade da lacase é crescente a partir das 24h, com pico de 7,5 U.L⁻¹ as 72 horas. Apesar do alto valor de atividade da lacase, o valor máximo de descoloração foi de 16,8% as 72 horas. O pH do teste acidifica de 24h (6,1) para 72h (5,7), o pH do controle tem um média de 6 nos três intervalos de tempo. Verifica-se que com a adição da sacarose o aumento da biomassa fúngica é perceptivelmente maior comparada com os Ensaio apresentados anteriormente (1 a 4), com valor máximo obtido para biomassa de 160,25 mg.100mL⁻¹ com 72 horas de cultivo. Na Figura 12 fica nítido que o fungo cresceu e não adsorveu o corante, o que comprova a capacidade de *L. crinitus* de degradar o corante Vermelho Congo. Em relação aos Ensaio 1 e 3 que contaram com a mesma concentração de corante, o Ensaio 5 apresentou os maiores valores de atividade enzimática e biomassa.

Figura 12 - Visualização do crescimento fúngico no ensaio 5



Fonte: Acervo do autor

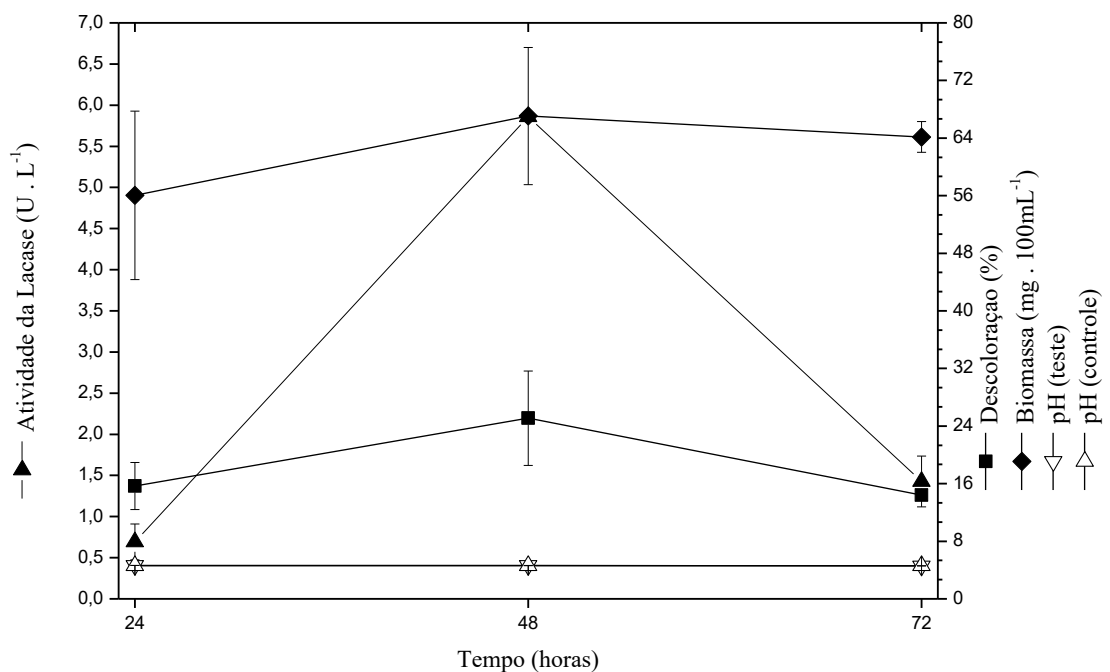
Figura 13 - Ensaio 6: Cinética de produção de lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 60 mg.L^{-1} , crescimento fúngico e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* CCIBT 2611 com adição de 5% de sacarose



No Ensaio 6 (Figura 13), observa-se um pico de atividade da lacase com 24 horas de cultivo no valor de $1,2 \text{ U.L}^{-1}$ e decréscimo da atividade enzimática nos outros intervalos de

tempo avaliados, o que sugere o efeito tóxico do aumento da concentração de corante. Por outra via, parece que a situação de estresse (alta concentração de corante) ativa um sistema de detoxificação do meio, que pode ser indicada pelo aumento da descoloração em relação ao Ensaio 5, sendo verificada 36% de descoloração com 48 horas. O pH do teste variou de 6 a 5,8 e o pH do controle de 6,2 a 5,9. A biomassa teve aumento gradativo de acordo com o tempo de cultivo de 24h, 48h e 72 horas com os valores de 95,99 mg.100mL⁻¹, 122,9 mg.100mL⁻¹ e 172,82 mg.100mL⁻¹ respectivamente, reforçando a importância da sacarose para o crescimento fúngico, conforme verificado no Ensaio 5. Ainda, com relação ao Ensaio 5, nota-se que na presença de sacarose e em maior concentração de corante há maior aumento da biomassa fúngica, diminuição da atividade da lacase e um nível de descoloração superior. Isso demonstra que a descoloração do corante não está diretamente relacionada ao aumento da biomassa fúngica.

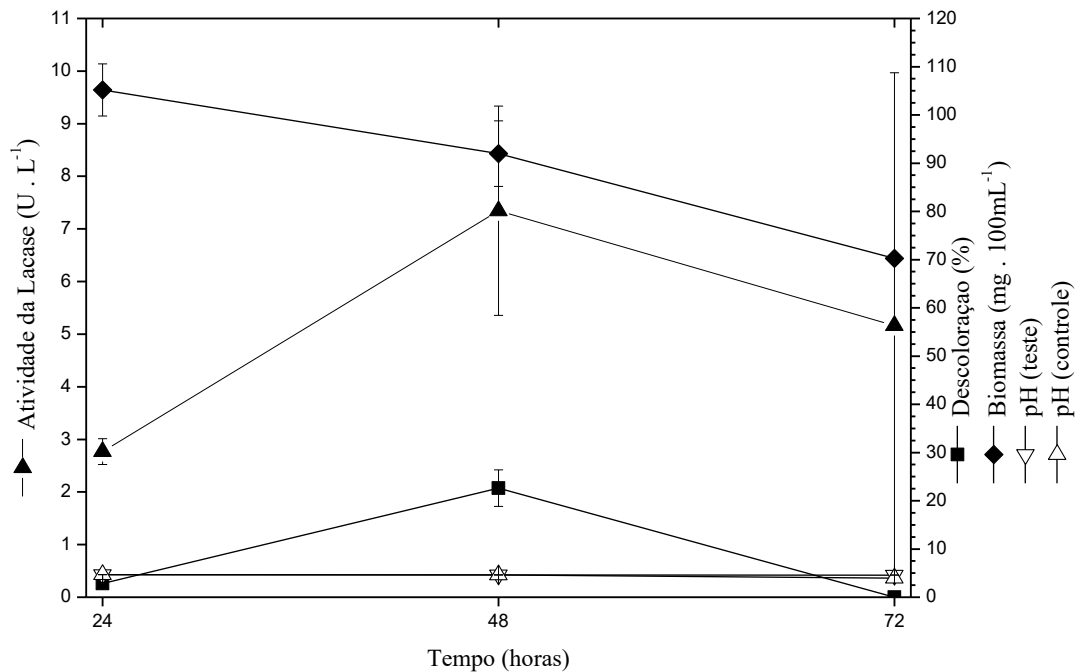
Figura 14 - Ensaio 7: Perfil de atividade enzimática, biomassa, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 20 mg.L⁻¹ e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus*, com adição de 2 mM de sulfato de cobre 5% de sacarose



No Ensaio 7 (Figura 14) observa-se que com 48 horas de cultivo do fungo *L. crinitus* há um pico de atividade da lacase (5,8 U.L⁻¹), com queda às 72h (1,4 U.L⁻¹). A máxima descoloração foi obtida com 48 horas (25,1%). O valor da biomassa com 24 horas de cultivo foi de 56,04 mg.100mL⁻¹ e nos tempos de 48 e 72 horas, com pico as 48h obtivesse 67,06 e

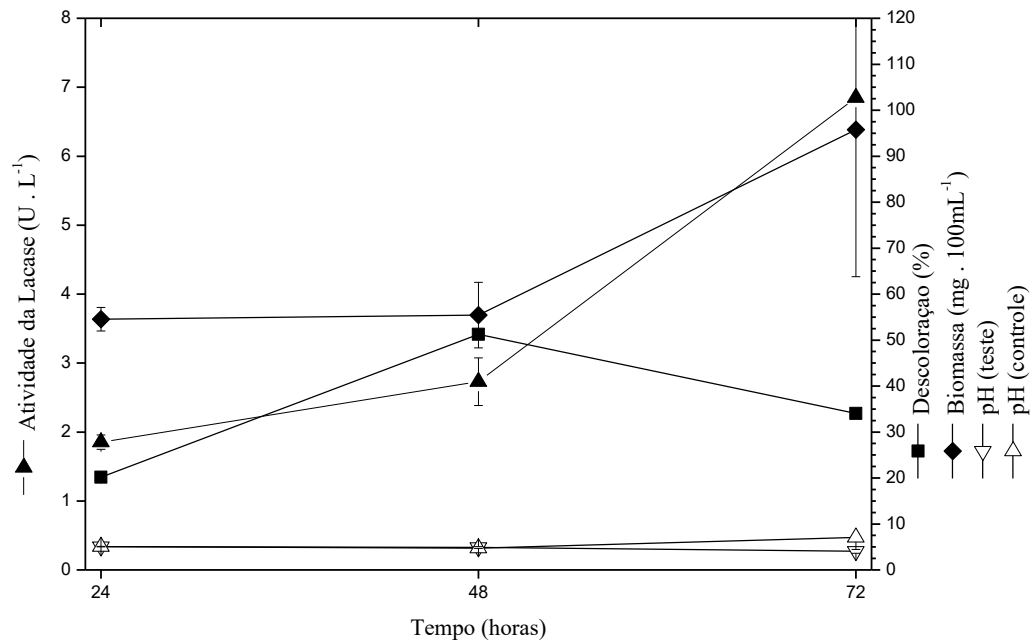
64,15 mg.100mL⁻¹ respectivamente. O pH tanto no teste como no controle em todos os intervalos de tempo foi igual a 4,6. Portanto, esse ensaio mostra que o pico da atividade enzimática, descoloração e biomassa foram as 48h com pH estabilizado em 4,6.

Figura 15 - Ensaio 8: Perfil da atividade da lacase, biomassa, descoloração do corante vermelho Congo na concentração de 60 mg.L⁻¹ e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus*, com adição de 2 mM de sulfato de cobre 5% de sacarose



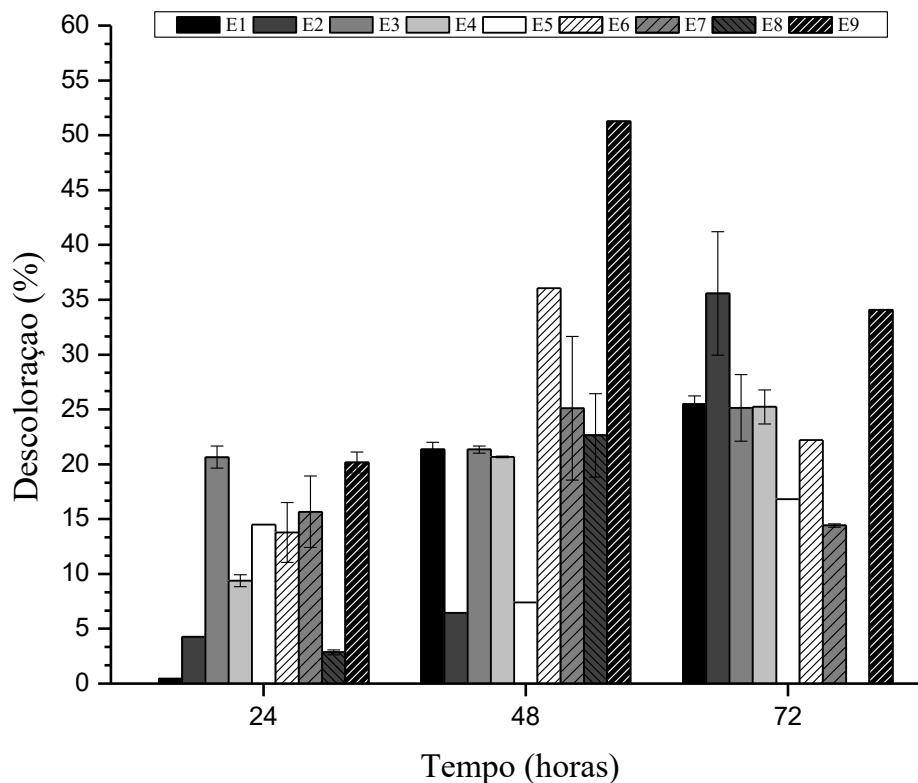
No Ensaio 8 (Figura 15), o valor máximo da atividade de lacase foi de 7,34 U.L⁻¹ com 48 horas de cultivo e os intervalos de tempo 24h e 72h foram 2,77 U.L⁻¹ e 5,16 U.L⁻¹ respectivamente. A descoloração foi verificada apenas com 24h (2,85 %) e 48 horas (22,63 %). A maior biomassa no valor de 105,17 mg.100mL⁻¹ as 24 horas e 91,98 mg.100mL⁻¹, 70,26 mg.100mL⁻¹ nos outros intervalos de tempo avaliados. O pH do teste variou de 4,7 a 4,6 das 24h às 72h respectivamente. O pH do controle variou de 4,7 a 4,0 nos intervalos de tempo de 24h a 72h.

Figura 16 - Ensaio 9: Perfil da atividade de lacase, descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 40 mg.L^{-1} , crescimento fúngico e pH referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* CCIBT 2611, com adição de 1 mM sulfato de cobre CuSO_4 e $2,5\%$ sacarose



No Ensaio 9 (Figura 16) observou-se no ponto central a atividade máxima da lacase de $6,8 \text{ U.L}^{-1}$ com 72 horas de cultivo. Sendo essa a segunda maior atividade de lacase obtida entre os nove ensaios realizados, ficando o Ensaio 5 ($7,5 \text{ U.L}^{-1}$) com a maior atividade. O pico de descoloração foi de $51,27\%$ com 48 horas, as 24h e as 72h os valores foram $20,16\%$ e $34,06\%$ respectivamente. O valor máximo do crescimento fúngico é de $95,74 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ às 72 horas, $55,74 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ às 48 horas, e $54,53 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ às 24 horas. Considerando que a maior descoloração ocorreu associada a redução da biomassa, fica evidente que a descoloração não está diretamente relacionada ao aumento de biomassa. O pH do teste variou de $5,1$ as 24h para $4,1$ as 72h, já o pH do controle variou de $5,1$ as 24h para $7,1$ as 72h.

Figura 17 - Análise comparativa do percentual de descoloração referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9



Na análise comparativa do percentual de descoloração (Figura 17) os maiores valores de descoloração foram verificados no Ensaio 6 (nas condições de 5 % de sacarose e uma concentração de 60 mg.L⁻¹ de VC) e Ensaio 9 (ponto central, nas condições de 1 mM de CuSO₄, 2,5 % de sacarose e 40 mg.L⁻¹ de concentração de VC) com valores de 36,06 % e 51,27 %, respectivamente, às 48 horas.

No gráfico de superfície de resposta (Figura 18.A) verifica-se que os maiores valores de descoloração foram verificados nas maiores concentrações de corante. No entanto, o diagrama de Pareto (Figura 18.B) indica que estatisticamente as variáveis independentes (CuSO₄, sacarose e concentração de corante VC) não afetaram diretamente a descoloração ao nível de confiança de 95%.

Figura 18 - Gráfico de Superfície de Resposta do efeito da descoloração (A) Diagrama de Pareto sob influência da descoloração (B)

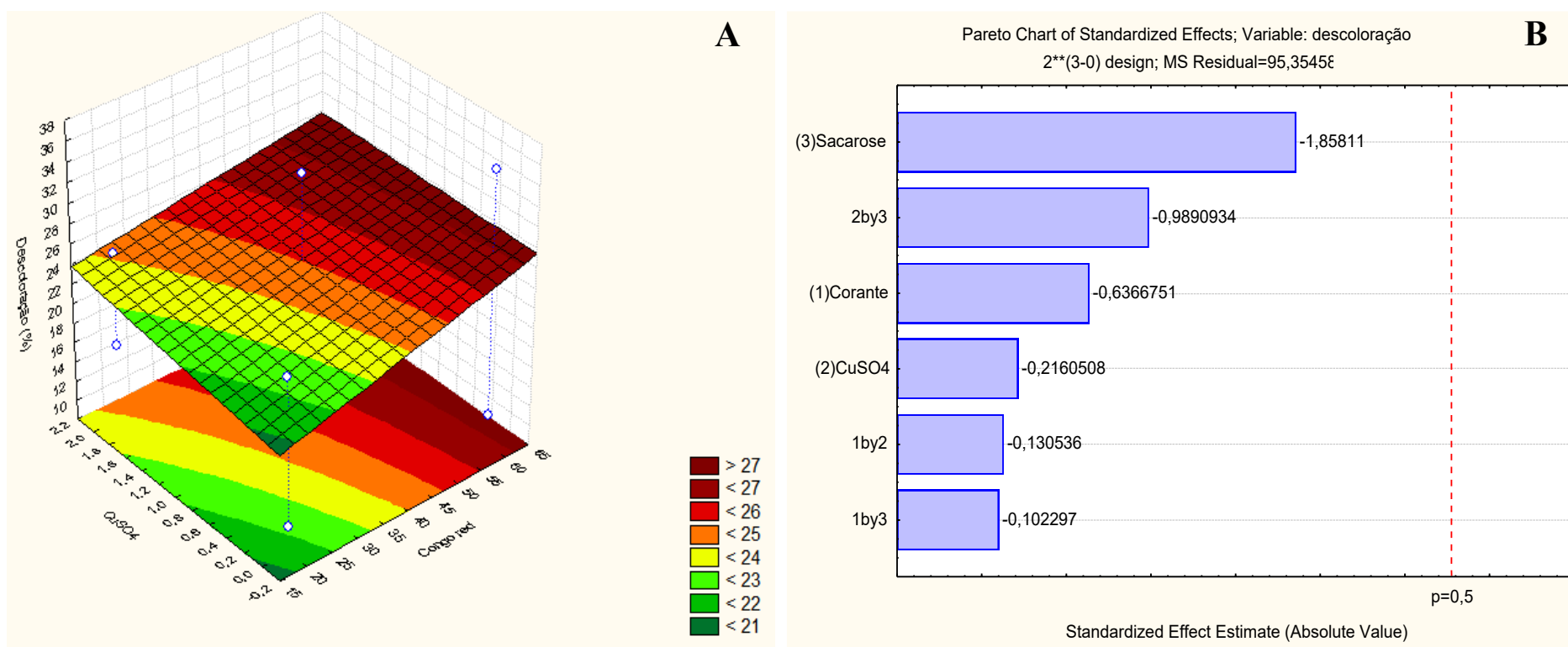
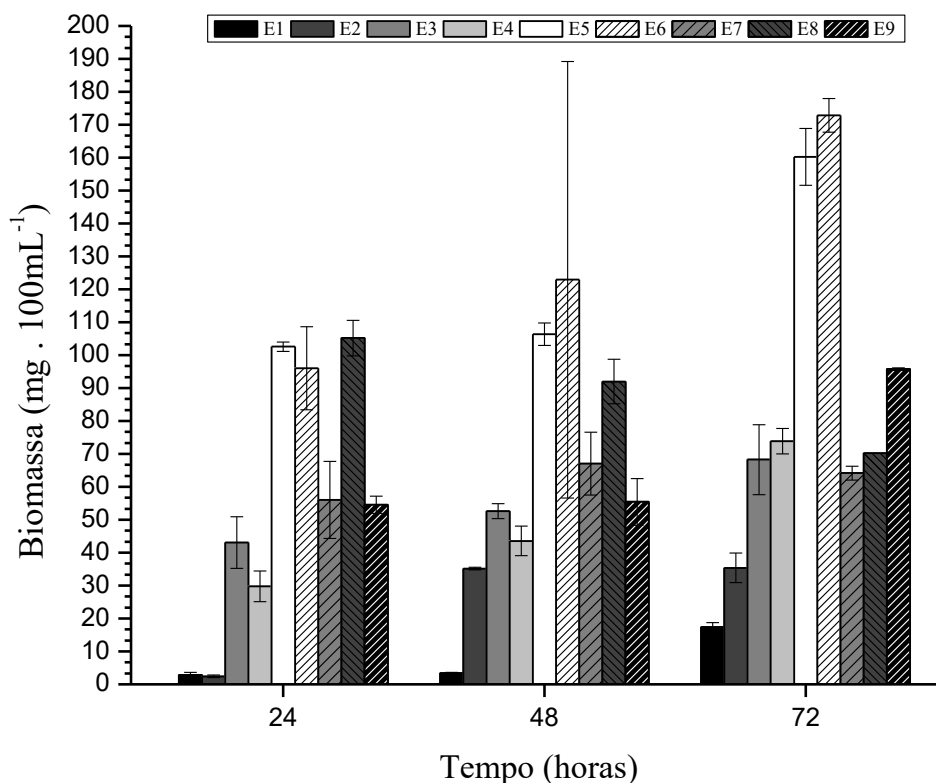


Figura 19 - Análise comparativa da biomassa fúngica referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9



Na Análise comparativa da biomassa fúngica de todos os ensaios (Figura 19) nota-se que com o aumento da concentração do corante ocorreu um aumento da produção de biomassa fúngica, conforme observado no Ensaio 1 (20mg.L^{-1}) e Ensaio 2 (60mg.L^{-1}), indicando que o corante pode ter sido utilizado pelo fungo como fonte de crescimento. A adição de sulfato de cobre a 2mM também favoreceu o crescimento microbiano. Isso pode ser verificado quando se compara os valores obtidos para biomassa nos ensaios realizados na ausência do indutor enzimático (CuSO_4) (Ensaio 1 e 2) e na presença do referido indutor (Ensaio 3 e 4).

Ainda, a adição da sacarose, um açúcar facilmente metabolizável, proporcionou altos valores de biomassa (Ensaio 5 e 6). Conforme verifica-se no gráfico de Superfície de resposta (Figura 20.A). A influência da sacarose e do sulfato de cobre no Diagrama de Pareto (Figura 20.B), assim como a interação entre essas variáveis, afetaram o crescimento microbiano ao nível de confiança de 95%.

Figura 20 - Gráfico de Superfície de Resposta em relação a biomassa fúngica (A) Diagrama de Pareto sobre efeito da biomassa (B)

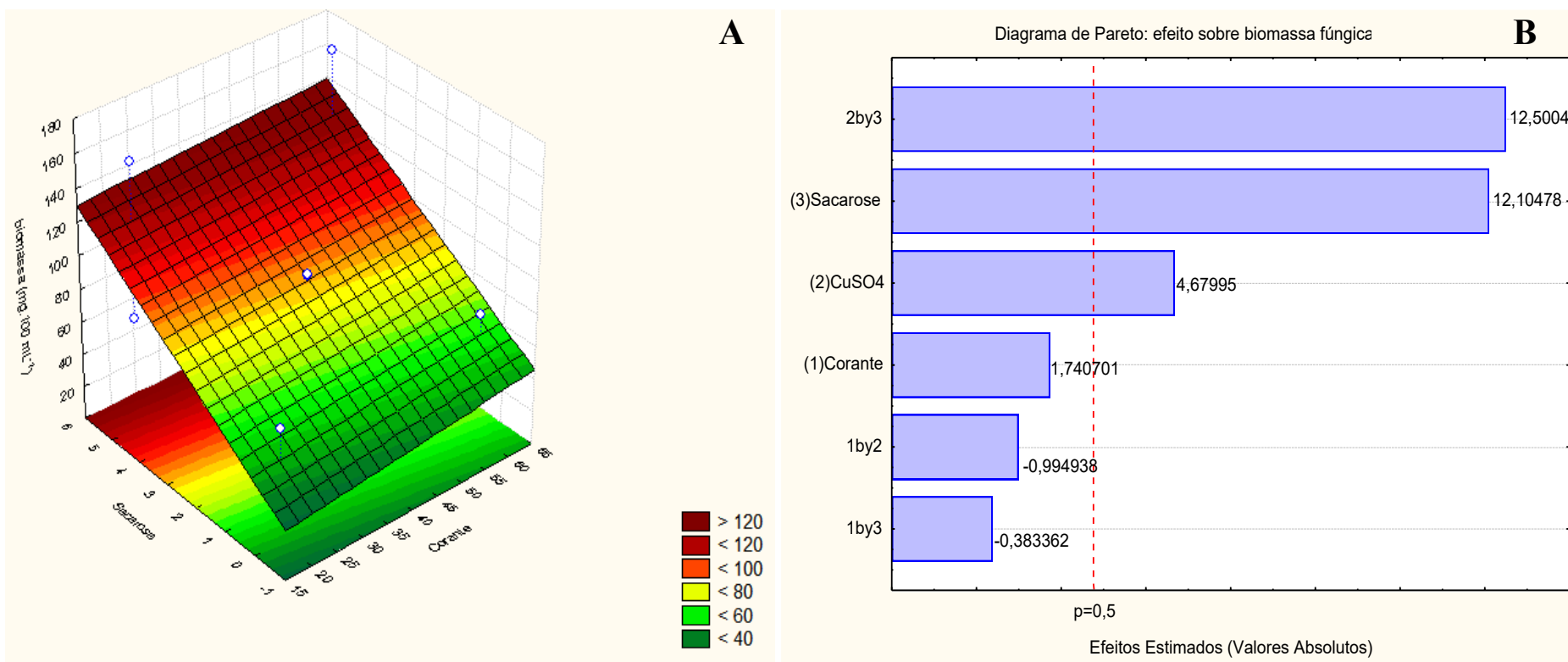
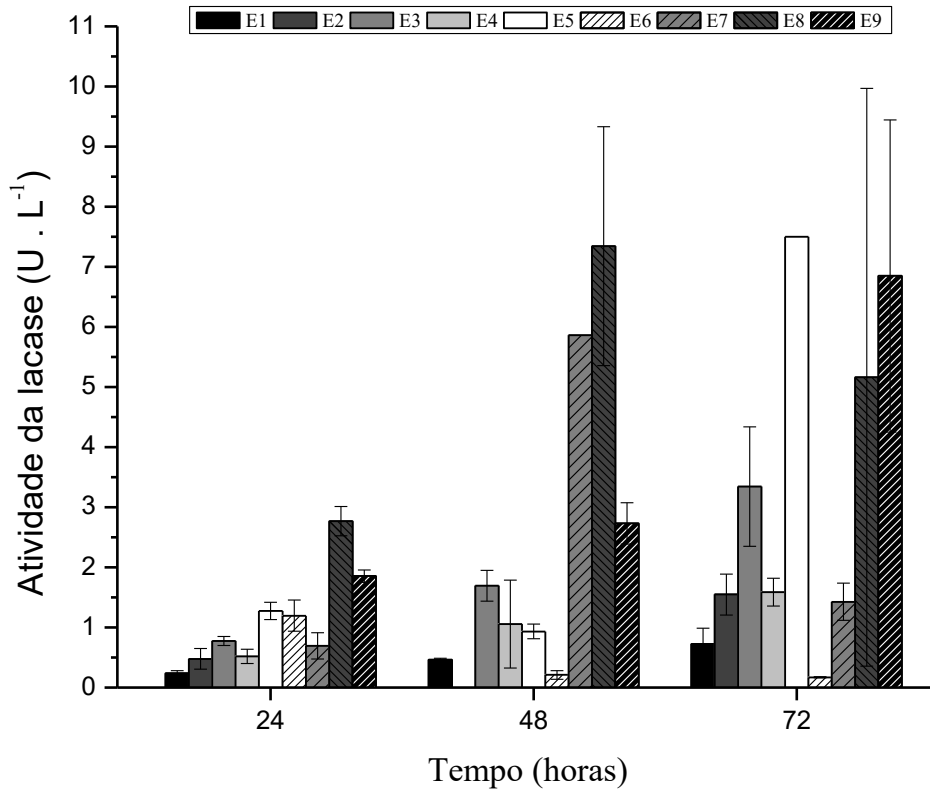
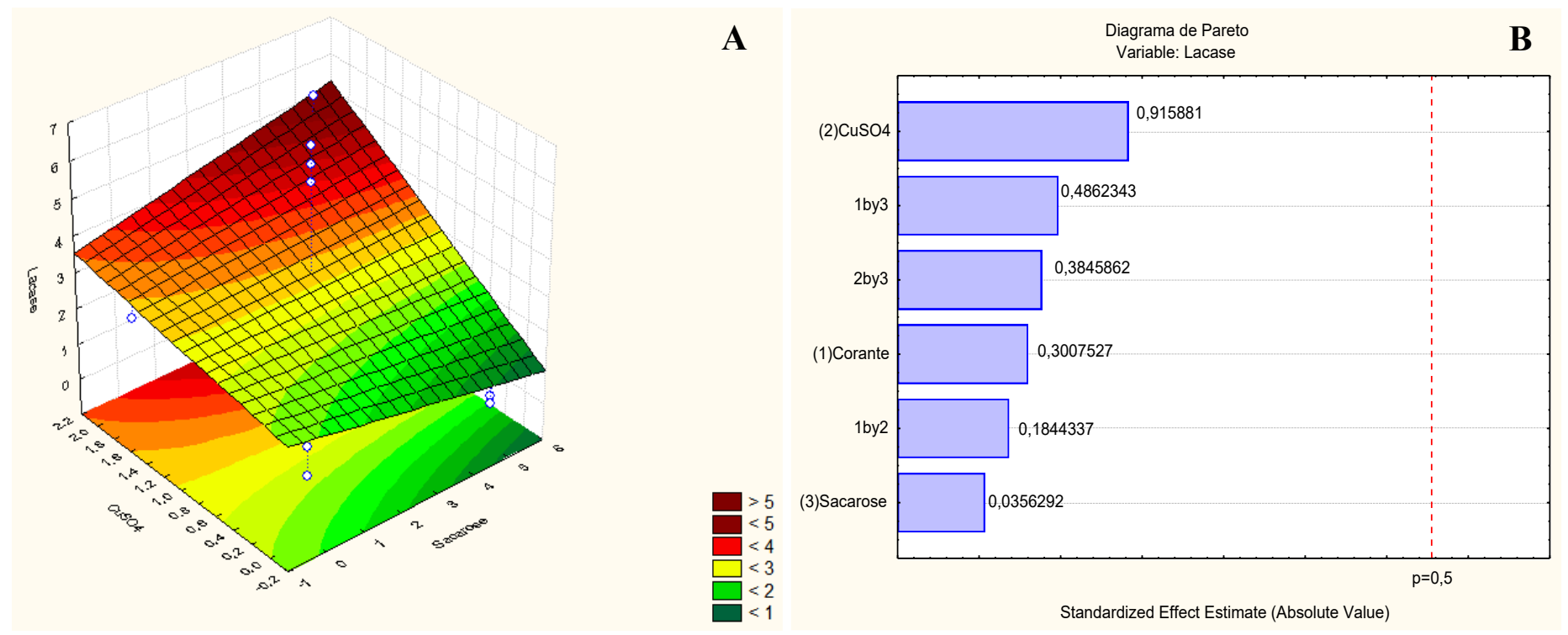


Figura 21 - Análise comparativa da produção da enzima lacase referente ao cultivo do fungo *L. crinitus* na descoloração do corante Vermelho Congo dos ensaios 1 a 9



Na análise comparativa da atividade da lacase de todos os ensaios (Figura 21) observa-se que em presença de sacarose ocorrem maiores níveis de produção de lacase, conforme verifica-se no gráfico de superfície de resposta (Figura 22.A), o que não foi confirmado pelo teste estatístico do Diagrama de Pareto (Figura 22.B). Por outra via a adição de sulfato de cobre estimulou a atividade de lacase, principalmente no Ensaio 9 (1mM), sendo que nos ensaios 3,4,7 e 8, a atividade de lacase parece ter sido inibida pela alta concentração de sulfato de cobre (2mM).

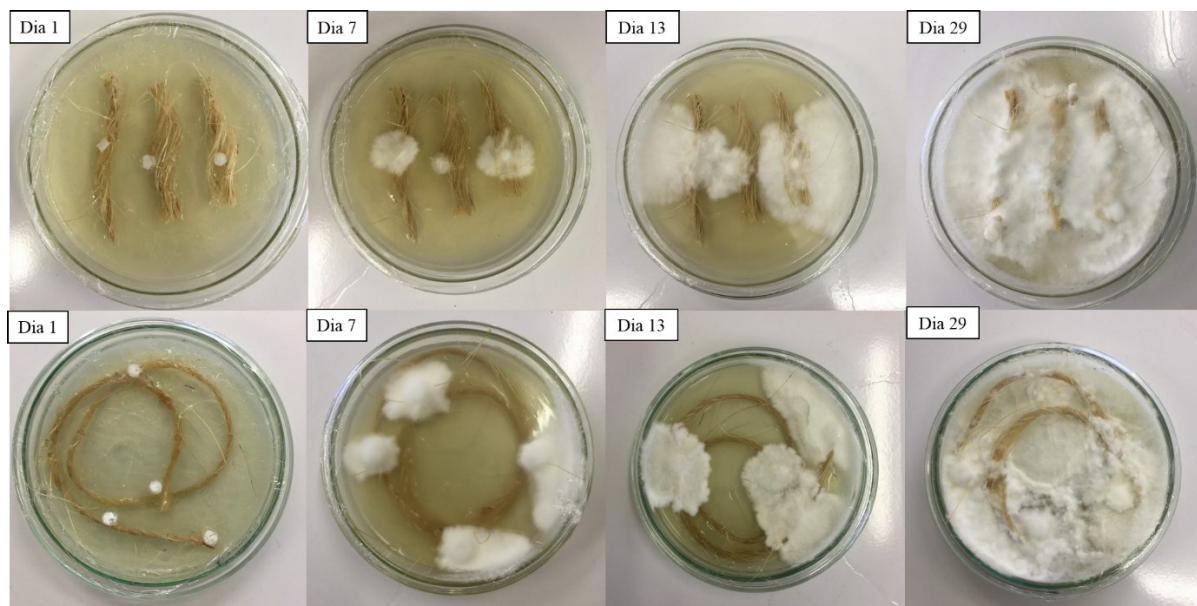
Figura 22 - Superfície de resposta: efeito sobre a atividade de lacase (A) Diagrama de Pareto: efeito sobre a atividade da lacase (B)



5.2 RESULTADOS DA AMPLIAÇÃO DE ESCALA

O fungo imobilizado no sisal teve um crescimento gradativo, sendo que nos primeiros dias de incubação o fungo preferiu meio de cultura, mas ao final de 29 dias o sisal estava todo colonizado (Figura 23).

Figura 23 - Crescimento do fungo imobilizado sisal durante os 29 dias



Fonte: Acervo do autor

A Figura 24 apresenta os perfis de produção de lacase ($U.L^{-1}$), degradação do corante Vermelho Congo (%) e pH no ensaio de ampliação de escala. Observa-se que o pH nos testes sofreu uma acidificação em relação ao controle. A descoloração foi verificada a partir do 3 dia de incubação (16,5%) sendo que com o passar do tempo a descoloração aumentou com máximo de 66,8% aos vinte e um dias. A produção de lacase apresentou perfil semelhante ao de descoloração, com máxima produção de $16,2 U.L^{-1}$ aos 21 dias. Na Figura 25 observa-se os ensaios da ampliação de escala no primeiro dia de incubação. Na Figura 26 apresenta a descoloração do corante VC por *L. crinitus* ao final de 21 dias de incubação no escuro, com suas respectivas biomassas fúngicas na Figura 27.

Figura 24 - Perfil da atividade da lacase, descoloração do corante VC e pH na concentração de 40 mg.L^{-1} , na ampliação de escala referente ao cultivo do fungo *Lentinus crinitus* CCIBT 2611, 1mM sulfato de cobre e 2,5% de sacarose

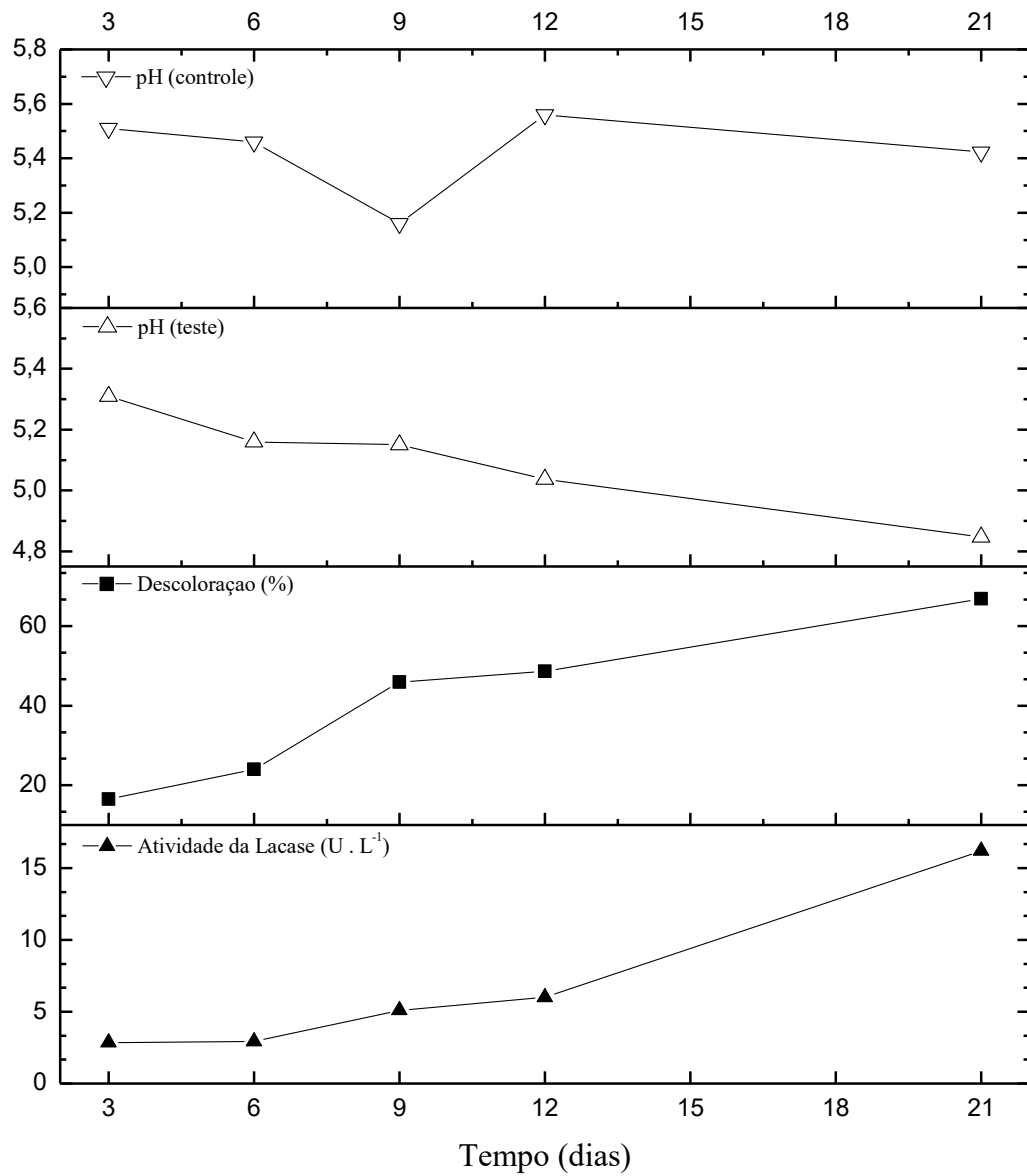


Figura 25 - Primeiro dia de incubação do ensaio de ampliação de escala

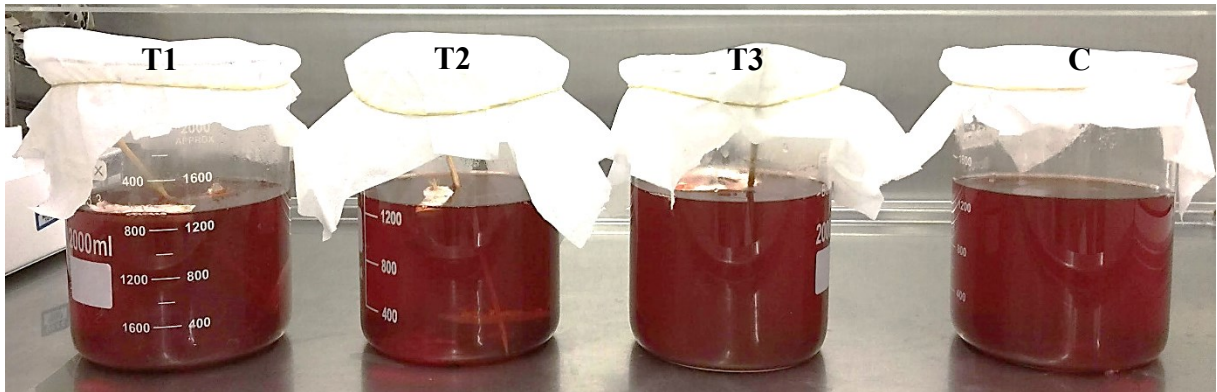


Figura 26 - Último dia de incubação do ensaio de ampliação de escala

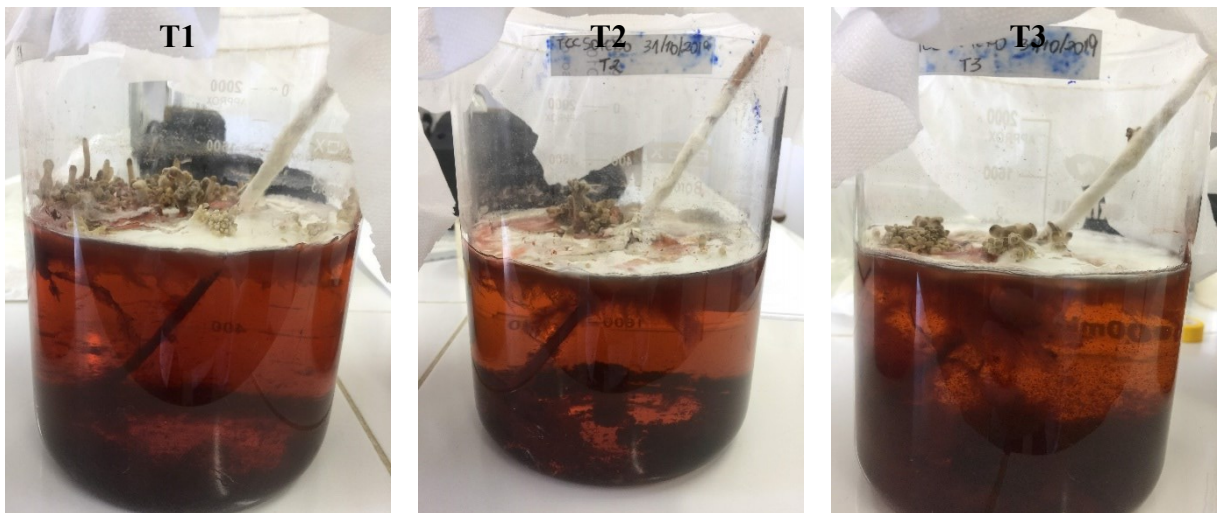
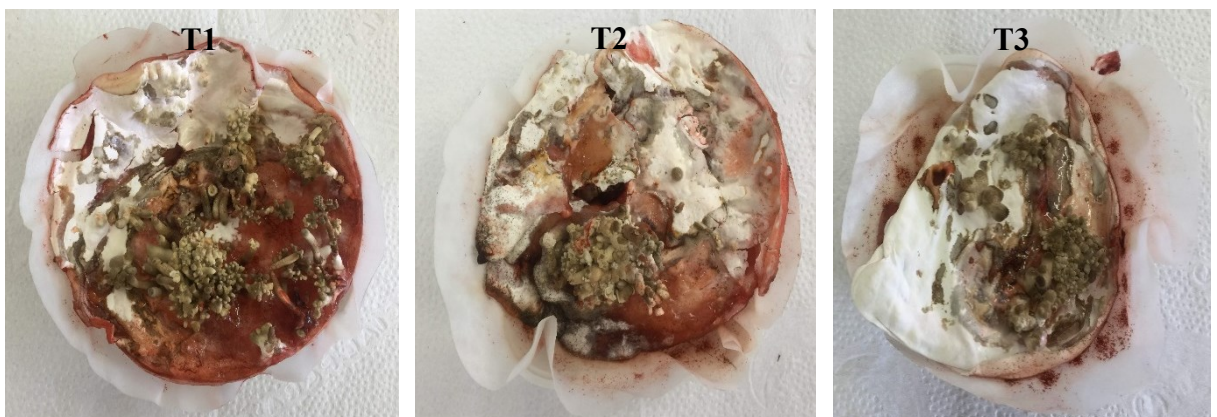


Figura 27 - Biomassa do ensaio de ampliação de escala no último dia de incubação



DISCUSSÃO

Em trabalhos realizado anteriormente em nosso laboratório verificou-se que a concentração de corante Vermelho Congo superiores a 20 mg.L⁻¹ eram tóxicas para o fungo *L. crinitus*, o que foi demonstrado pela redução da biomassa fúngica (SILVA, 2015). No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a adição de sulfato de cobre e de sacarose ao sistema de degradação favorecem o aumento da tolerância do fungo *L. crinitus* a concentrações mais altas do corante. Isso justifica-se porque o sulfato de cobre é um importante indutor e mediador da atividade de lacase (SOARES, 2016; SOTERO et al. 2017).

Soares (2016) obteve o mesmo perfil de produção de lacase nas mesmas condições de cultivo proposto por este trabalho no Ensaio 3, chegando a valores máximo de atividade enzimática às 72 h de cultivo.

A produção de lacase é mediada por íons de cobre em fungos de podridão-branca (KUMAR et al., 2015; PALMIERI et al., 2000), sendo que altas concentrações de CuSO₄ podem atuar inibindo a atividade de lacase (BALLAMINUT, 2017).

Embora a adição de sacarose não tenha influenciado diretamente a descoloração ou a produção de lacase, a presença de um carboidrato facilmente metabolizável, é essencial para a manutenção do crescimento microbiano (VANDELUN ADO et al., 2019), assim a ação sinérgica entre esses dois fatores, sulfato de cobre e sacarose, parece ter auxiliado o fungo a tolerar altas concentrações do corante por outra via, (DHAKAR; PANDEY, 2013) verificaram que fontes de carbono como maltose, sacarose, amido e celulose são inibidoras da produção de lacase por pelo fungo *Trametes hirsuta*.

Segundo Vitali et al., (2018) o fato o fungo não ter adsorvido o corante azo nas hifas facilita a degradação desse corante pelas enzimas extracelulares e compostos de baixa massa molecular.

Em Valle et al. (2014) a concentração de CuSO₄ e nitrogênio no meio de cultivo afetou a produção de lacase por *Lentinus crinitus*. E a capacidade de descoloração correlacionar-se com a atividade da lacase na degradação do vermelho congo (TYCHANOWICZ et al., 2004; SANTANA et al., 2018).

A produção de lacases por fungos basidiomicetos também é favorecida em pH ácido (KUMAR et al., 2015, KUMAR et al., 2017), sendo que a acidificação do meio pode ocorrer pela produção de ácidos orgânicos pelo próprio fungo (GALHAUP et al., 2002; MATHEUS et al., 2003; MÄKELÄ et al., 2002)

Ainda a descoloração do corante pode ocorrer devido a produção de compostos de baixa massa molecular e enzimas acessórias produzidas por basidiomicetos (VITALI, 2018; MOREIRA-NETO, 2013)

A diminuição observada na atividade da lacase e na concentração de proteínas pode ter sido devido à liberação de proteases durante a autólise dos grânulos de fungos que depois degradaram as enzimas extracelulares (NYANHONGO, 2002) ou pela produção de biossurfactantes (REIS 1998).

Silva et al (2019) relacionaram a descoloração do corante VC a ação da lacase de *Lentinus sp* devido a ocorrência de duas pontes de hidrogênio entre o corante e a lacase.

O trabalho de Iark et al. (2019) reforça a ideia de que a degradação do vermelho do congo e a ação de detoxificação do efluente são fenômenos ligados à atividade da lacase. A lacase desempenha papel significativo que pode clivar o grupo cromóforo e diferentes ligações covalentes, degradação eficiente do composto. Por isso que a descoloração de corantes por lacase é simples e barata (REDA; HASSAN; EL-MOGHAZY, 2018).

CONCLUSÃO

- A adição do mediador enzimático sulfato de cobre (CuSO_4), bem como da sacarose favoreceram o aumento da tolerância do fungo a concentrações de corante superiores a 20 mg.L^{-1} ;
- O pH acidificado favorece a produção enzimática e aumento da biomassa fúngica;
- A descoloração não está diretamente relacionada ao aumento da biomassa mesmo que em presença de sacarose tenha influenciado esse aumento;
- A ampliação de escala reproduziu o melhor resultado proposto no planejamento fatorial em relação a descoloração e obteve uma maior descoloração de 66,8% em 21 dias de incubação;
- Ainda, a aplicação de *Lentinus crinitus* no tratamento de águas residuárias apresenta-se promissor, visto que a lacase desse fungo é capaz de detoxificar o efluente, confirmando o caráter *ecofriendly* dessa enzima.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, W. S. et al. Application of *Mangifera indica* (mango) seeds as a biosorbent for removal of Victazol Orange 3R dye from aqueous solution and study of the biosorption mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 209, p. 577–588, out. 2012.
- 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, P. H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3463–3473, 2018.
- AMIRI, S; MAZAHERI, M; MOHAMMAD VALI SAMANI, J. Introducing a general framework for pollution source identification in surface water resources (theory and application). **Journal of Environmental Management**, v. 248, p. 109281, 2019.
- ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 541–555, abr. 2011.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- ARUN, A.; EYINI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8063–8070, set. 2011.
- ASIF, M. B. et al. Impact of simultaneous retention of micropollutants and laccase on micropollutant degradation in enzymatic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 473–480, nov. 2018.
- BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 78–91, jan. 2003.

BALLAMINUT, Nara. **Caracterização do processo de descoloração de corante reativo diazo por basidiomicetos tropicais**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BALLAMINUT, N. et al. Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n 4, p. 561-570. 2014.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology** 38(2):248-252, 2007.

BHOI, Y. P. et al. Visible light driven efficient photocatalytic degradation of Congo red dye catalyzed by hierarchical $\text{CuS-Bi}_2\text{Cu}_x\text{W}_{1-x}\text{O}_{6-2x}$ nanocomposite system. **RSC Advances**, v. 6, n. 42, p. 35589–35601, 2016.

BOSCO, F.; MOLLEA, C.; RUGGERI, B. Decolorization of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*: the role of biosorption and biodegradation. **Environmental Technology**, v. 38, n. 20, p. 2581–2588, 18 out. 2017.

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

CASTROVILLI, M. C. et al. The convergence of forefront technologies in the design of laccase-based biosensors – An update. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115615, out. 2019.

CHAKRABORTY, S. et al. Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 662–666, nov. 2013.

CHEN, K-C. et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 57–68, 2003.

COELHO, G. D. et al. Characterization of a thermostable *Deconica castanella* Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 908–915, 21 out. 2019.

COLIN, N. et al. Ecological impact and recovery of a Mediterranean river after receiving the effluent from a textile dyeing industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 295–303, 2016.

COMPART, L. C. A. **Suporte cerâmico para imobilização de basidiomicetos em biorremediação de solos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

DE LORENZO, V. Biodegradation and Bioremediation: An Introduction. In: STEFFAN, R. (Ed.). *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation*. Cham: Springer International Publishing. p. 1–21, 2018.

DELLAMATRICE, Priscila Maria. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DHAKAR, K.; PANDEY, A. Laccase Production from a Temperature and pH Tolerant Fungal Strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). **Enzyme Research**, p. 9, 2013.

DOBLE, M.; KUMAR, A. Textile Effluent. In: **Biotreatment of Industrial Effluents**. [s.l.] Elsevier. p. 123–132, 2005.

EOS, C. **Poluição dos recursos hídricos e a responsabilidade social**. Disponível em: <<https://www.eosconsultores.com.br/poluicao-dos-recursos-hidricos/>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

FARIA, M. G. I. et al. Lithium bioaccumulation in *Lentinus crinitus* mycelial biomass as a potential functional food. *Chemosphere*, v. 235, p. 538–542, nov. 2019.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, dez. 2013.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 529–536. 2002.

HERNÁNDEZ, C. A. et al. Light-induced inhibition of laccase in *Pycnoporus sanguineus*. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 2, p. 137–142, 2016.

HOSSAIN, L; SARKER, S. K; KHAN, M. S. Evaluation of present and future wastewater impacts of textile dyeing industries in Bangladesh. **Environmental Development**, v. 26, p. 23–33, 2018.

IARK, D. et al. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121655, out. 2019.

ITO, T. et al. Processo de remediação natural de longo prazo em sedimentos de rios poluídos por corantes têxteis, impulsionados por mudanças na comunidade bacteriana. **Water Research**, v. 100, p. 458-465, 2016.

KHURANA, R. et al. Is Congo red an amyloid-specific dye? *Journal Biol. Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 22715-22721, 2001.

KHOUNI, I; MARROT, B; MOULIN, P; et al. Decolourization of the reconstituted textile effluent by different process treatments: Enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. **Desalination**, v. 268, n. 1–3, p. 27–37, 2011.

KUMAR, A. et al. Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 68–75, 2015.

KUMAR, A. et al. Gel-Based Purification and Biochemical Study of Laccase Isozymes from *Ganoderma* sp. and Its Role in Enhanced Cotton Callogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 674, 2017.

LI, Y. et al. Production and optimization of bamboo hydrochars for adsorption of Congo red and 2-naphthol. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 379–386, 2016.

LI, X.-L. et al. Rapid discovery and functional characterization of diterpene synthases from basidiomycete fungi by genome mining. **Fungal Genetics and Biology**, v. 128, p. 36–42, jul. 2019.

LIU, G; ZHANG, Y; KNIBBE, Willem-Jan; et al. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. **Water Research**, v. 116, p. 135–148, 2017.

LIU, Y. et al. Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: a review. **Bioresource Technology**, p. 122511, nov. 2019.

LOECKE, T. D. et al. Weather whiplash in agricultural regions drives deterioration of water quality. **Biogeochemistry**, v. 133, n. 1, p. 7–15, 2017.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, abr. 2015.

MATHEUS, D. R. et al. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 16: 415-421, 2000.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R., MACHADO, K. M. G., SILVA, R. R. & RODRIGUES, T. A. Growing Basidiomycetes In Bioreactors to be Applied To Bioremediation of HCB in Soil. Paper G-05, IN: Magar, V. S., Kelley, M. E. (Eds.), **In Situ and On-Site Bioremediation**, 2003.

MACHADO, K. M. G. et al. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.297-301, 2005.

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

MÄKELÄ, M. et al. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 542–549, abr. 2002.

MAYER, A. M; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, jul. 2002.

MEHANDIA, S.; SHARMA, S. C.; ARYA, S. K. Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. **Biotechnology Reports**, p. e00413, dez. 2019.

MOREIRA-NETO, S. L. et al. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2665-2673, 2011.

MOREIRA-NETO, S. L. et al. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. **Letters Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 283-290, 2013.

MØLLER, P; WALLIN, H. Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 462, n. 1, p. 13–30, 2000.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Congo red, CID=11313, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Congo-red> (accessed on Nov. 27, 2019).

NEPOMUCENA, R. M. P. **Avaliação do potencial microbiano do crescimento e de secreção de lacase do fungo amazônico *Lentinus crinitus***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

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

NIMKAR, U. Sustainable chemistry: A solution to the textile industry in a developing world. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 9, p. 13–17, fev. 2018.

NYANHONGO, G. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 3, p. 259–263, 2002.

OKINO, L. K. et al. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 16:889-893, 2000.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 2014.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; et al. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920–924, 2000.

PANDI, A. et al. A sustainable approach for degradation of leather dyes by a new fungal laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 590–597, fev. 2019.

PERALTA, R. M. et al. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, p. 119–149, 2017.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, p. 996-1006, 2012.

PRAMANIK, S.; CHAUDHURI, S. Laccase Activity and Azo Dye Decolorization Potential of *Podoscypha elegans*. **Mycobiology**, v. 46, n. 1, p. 79–83, 2 jan. 2018.

PRASAD, A. S. A.; RAO, K. V. B. Aerobic biodegradation of Azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616; an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7469–7481, ago. 2013.

PUBCHEM. Congo red. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11313>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

REDA, F. M.; HASSAN, N. S.; EL-MOGHAZY, A.-N. Decolorization of synthetic dyes by free and immobilized laccases from newly isolated strain *Brevibacterium halotolerans* N11 (KY883983). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 138–145, jul. 2018.

REIS, F.A.S.L. **Estudo da síntese de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* ATCC6633**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, 1998.

REIS, Luis Gustavo Texeira. **Degradação do corante Vermelho Congo em solução aquosa através de plasma obtido por eletrólise de alta tensão**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

RODAK, P. C.; PAULISTA, P. F. **Aplicação de lacases na degradação de corantes sintéticos**. 26 jun. 2017.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. **The Open Textile Journal**, 5, 1-7, 2012.

SANTANA, T. T. et al. Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 625–630, 2018.

SATHISHKUMAR, K. et al. Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye congo red and textile effluent. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 200, p. 111655, nov. 2019.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19–38, jan. 2016.

SHETTI, N. P. et al. Electrochemical detection and degradation of textile dye Congo red at graphene oxide modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 387–392, maio 2019.

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

SILVA, M. A. et al. Descoloração do corante azoico direct red 28 in vitro pelo extrato bruto produzido por *Lentinus crinitus* em vagem de amendoim. In: IX Congresso Brasileiro de Micologia, Manaus/AM, 2019.

SINGH, G.; ARYA, S. K. Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 1070–1084, ago. 2019.

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**. Monografia (Bacharel em Engenharia de Biotecnologia) Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2016.

SOTERO, K. K. S. et al. 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.

STRONG P.J., 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.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 1–17, jul. 1995.

TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A; DE SOUZA, C. G. M; et al. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 855–859, 2004.

UMBUZEIRO, G. A. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v. 60, n. 1, p. 55–64, 2005.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 15, jun. 2016.

VALLE, J.S.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SANTANA, T.T.; et al. Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8544–8551, 2014.

VANDELUN ADO, B; ANTHONY ONILUDE, A; APEH OLUMA, H. O; et al. Production of Fungal Laccase under Solid State Bioprocessing of Agroindustrial Waste and Its Application in Decolourization of Synthetic Dyes. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, p. 1–17, 2019.

VITALI, V. M. V. et al. Decolorization of CI Reactive Blue 222 by immobilized basidiomycetes in response to different carbon and nitrogen inputs. **Hoehnea**, v. 45, n. 2, p. 352–360, jun. 2018.

XU, J.; WANG, P. Mitochondrial inheritance in basidiomycete fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 29, n. 3–4, p. 209–219, dez. 2015.

XUE, F. et al. Residual micro organic pollutants and their biotoxicity of the effluent from the typical textile wastewater treatment plants at Pearl River Delta. **Science of The Total Environment**, v. 657, p. 696–703, 2019.

ZHANG, C. et al. Towards sustainable water resources planning and pollution control: Inexact joint-probabilistic double-sided stochastic chance-constrained programming model. **Science of The Total Environment**, v. 657, p. 73–86, 2019.

ZHANG, Y.M. et al. Planning of water resources management and pollution control for Heshui River watershed, China: A full credibility-constrained programming approach. **Science of The Total Environment**, v. 524–525, p. 280–289, 2015.