

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**“UTILIZAÇÃO DE BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS NA
DEGRADAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS E NO TRATAMENTO DO
EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.”**

Juliana Gisele Belote

Bióloga

Prof^a Dr^a Lúcia Regina Durrant

Orientadora

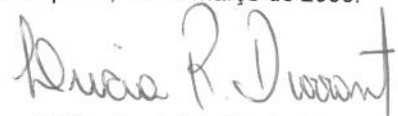
Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

PARECER

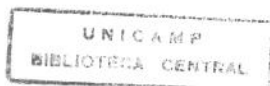
Campinas, fevereiro de 2000

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Juliana Gisele Belote, aprovada pela Comissão Julgadora em 14 de março de 2000.

Campinas, 14 de março de 2000.



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca



99790006166

UNIDADE	B.C
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	B418u
V.	Ex.
TOMBO	40973
PREÇO	278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	19/04/00
N.º CPD	

CM-00142025-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B418u

Belote, Juliana Gisele

Utilização de basidiomicetos ligninolíticos na
degradação de corantes industriais e no tratamento do
efluente de uma indústria de alimentos / Juliana Gisele
Belote. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Lúcia Regina Durrant.

Dissertação (mestrado) – Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos.

1. *Phanerochaete*. 2. *Pleurotus*.

3. Biodegradação. 4. Corantes. I. Durrant, Lúcia Regina.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Lúcia Regina Durrant

(ORIENTADORA)



Prof. Dr. José Luiz Pereira

(MEMBRO)



Prof. Dr. Ranuffo Monte Alegre

(MEMBRO)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(MEMBRO)

Rir e correr o risco de parecer tolo.

Chorar e correr o risco de parecer sentimental.

Estender a mão e correr o risco de se envolver.

Expor seus sentimentos e correr o risco de mostrar seu verdadeiro eu.

Defender seus sonhos e idéias diante da multidão e correr o risco de perder as
pessoas.

Amar e correr o risco de não ser correspondido.

Viver e correr o risco de morrer.

Confiar e correr o risco de se decepcionar.

Tentar e correr o risco de fracassar.

Mas os riscos devem ser corridos, porque o maior perigo é não arriscar nada.

As pessoas podem evitar sofrimentos e decepções, mas não conseguem nada,

não sentem, não mudam, não crescem, não amam, não vivem.

Acorrentadas por sua “liberdade”, elas viram escravas dela, somente a pessoa que
corre riscos é livre”.

Olavo Bilac

Àos meus pais,

*Pelo incentivo, apoio e acima de tudo pelo imenso amor presente em todos os
momentos da minha vida.*

A minha irmã Flávia e aos meus irmãos Marcos e Carlos,

Porque sem vocês seria muito mais difícil!

À Vinicius,

*Teus olhos são meus livros.
Que livro há aí melhor,
Em que melhor se leia
A página do amor?*

(Machado de Assis)

TE AMO!

Dedico

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por sempre estar presente em mais uma realização na minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant, minha orientadora, pela orientação, amizade, incentivo durante toda esta etapa.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À Banca Examinadora, pelas valiosas correções.

À indústria CHR HANSEN, pela disposição e pelo fornecimento dos corantes naturais e amostras do efluente.

Ao Cosme, pela competência e paciência.

Ao pessoal da Biblioteca, do Microcentro e ao Jonas do Xérox, pela colaboração.

Ao Rubens e a Maria Inês, por todo carinho, incentivo e apoio constantes que tenho recebido.

À Karla e ao Alex, pela grande ajuda e amizade. Vocês são demais!

Ao pessoal do laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pelas horas de alegrias, e em especial à Dani e ao Hamilton, pela amizade e colaboração.

Aos amigos Egito e Joaquim, pela amizade e ajuda na parte prática.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	II
RESUMO	1
ABSTRACT	2
I - INTRODUÇÃO.....	3
II – REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1- BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E CORANTES	8
2.2- ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR FUNGOS	12
2.2.1 <i>Lacase (EC 1.10.3.2)</i>	14
2.2.2 <i>Peroxidases</i>	15
2.2.2.1. <i>Lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)</i>	15
2.2.2.2 <i>Manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.7)</i>	18
2.2.3 - <i>Álcool veratrílico oxidase (AVO)</i>	19
2.3- CORANTES: UTILIZAÇÃO E PROBLEMAS ECOLÓGICOS DECORRENTES DO SEU USO	21
III - OBJETIVOS	28

IV – MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 – MATERIAIS	29
4.1.1 – <i>Microorganismos</i>	29
4.1.2- <i>Meios de crescimento</i>	29
4.1.3- <i>Equipamentos</i>	31
4.1.4- <i>Reagentes e materiais específicos</i>	32
4.2- MÉTODOS.....	33
4.2.1- <i>Inoculação dos microrganismos</i>	33
4.2.2 - <i>Ensaio preliminar de descoloração</i>	34
4.2.3 - <i>Coleta e caracterização das amostras do efluente</i>	35
4.2.4 - <i>Determinação da DQO</i>	35
4.2.5 - <i>Caracterização do efluente</i>	36
4.2.6 – <i>Determinação do peso seco e variação do pH</i>	36
4.2.7 – <i>Atividades enzimáticas desenvolvidas nos meios de cultivo</i>	37
4.2.8 - <i>Verificação da degradação dos corantes</i>	38
V- RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1- <i>Seleção dos basidiomicetos capazes de degradar os corantes</i>	41
5.2 - <i>Características do efluente</i>	42
5.3- <i>Determinação do peso seco</i>	42
5.4- <i>Determinação do pH final</i>	45

<i>5.5- Determinação da DQO.....</i>	<i>48</i>
<i>5.6 –Atidades enzimáticas.....</i>	<i>50</i>
<i>5.7 -Verificação da descoloração dos corantes.....</i>	<i>57</i>
<i>5.8- Determinação da degradação dos corantes.....</i>	<i>76</i>
VI- CONCLUSÕES.....	82
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
VIII – ANEXOS.....	102
<i>1- Curva Padrão dos corantes.....</i>	<i>102</i>
<i>2- Cromatograma do corante New Coccine.....</i>	<i>103</i>
<i>3- Fotos dos meios descoloridos.....</i>	<i>104</i>

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). RH: substrato da enzima na forma reduzida; R•: forma radicalar oxidada (GOLD et al. 1989).....	17
Figura 2: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP). AH: substrato da enzima. A: forma radicalar oxidada (GOLD et al. 1989).....	19
Figura 3: Fórmulas estruturais, químicas e pesos moleculares dos corantes utilizados.....	27
Figura 4: Espectro de absorção do efluente bruto.	42
Figura 5: Peso seco de <i>Pleurotus sajor caju</i> (020) em 50 mL de meio de cultivo durante 12 dias de crescimento.....	44
Figura 6: Peso seco de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em 50 mL de meio de cultivo durante 12 dias de crescimento.....	44
Figura 7: Efeito do crescimento do <i>Pleurotus sajor caju</i> (020) no pH dos meios de cultivo.	46
Figura 8: Efeito do crescimento do <i>Phanerochaete chrysosporium</i> no pH dos meios de cultivo.	47
Figura 9: Porcentagem de Redução da Demanda Química de Oxigênio por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> nos meios de crescimento.	49

Figura 10: Porcentagem de Redução da Demanda Química de Oxigênio por

Pleurotus sajor caju (020) nos meios de crescimento.....50

Tabela 1: Atividades das enzimas manganês-peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), álcool veratrílico oxidase (AVO), lacase (LD usando o-dianisidina e LS usando siringaldazina como substrato) e peroxidase (PD usando o-dianisidine e PS usando siringaldazina como substrato), nos dias 4, 8 e 12 de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium* no meio 1 em diferentes corantes: chrome azurol S (CA); new coccine (NC); orange G (OG); combinação de corantes sintéticos (MS); carmim (C); urucum hidrossolúvel (UH).....55

Tabela 2: Atividades das enzimas manganês-peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), álcool veratrílico oxidase (AVO), lacase (LD usando o-dianisidina e LS usando siringaldazina como substrato) e peroxidase (PD usando o-dianisidine e PS usando siringaldazina como substrato), nos dias 4, 8 e 12 de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020) no meio 1 em diferentes corantes: chrome azurol S (CA); new coccine (NC); orange G (OG); combinação de corantes sintéticos (MS); carmim (C); urucum hidrossolúvel (UH); combinação de corantes naturais (MN) ; e no efluente (EF).....56

- Figura 11:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Chrome Azurol S* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.....59
- Figura 12:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Chrome Azurol S* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).60
- Figura 13:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *New coccine* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. 61
- Figura 14:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *New coccine* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....62
- Figura 15:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Orange G* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. 63
- Figura 16:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Orange G* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....64
- Figura 17:** Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes sintéticos durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.....65
- Figura 18:** Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes sintéticos durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....66

- Figura 19:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Carmim durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. 67
- Figura 20:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Carmim durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....68
- Figura 21:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Urucum hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.....69
- Figura 22:** Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Urucum hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....70
- Figura 23:** Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes naturais durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....71
- Figura 24:** Espectro de absorção do efluente durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).....72
- Figura 25:** Espectro de absorção do efluente durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.73
- Figura 26:** Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *chrome azurol S* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).....78

- Figura 27:** Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *new coccine* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).....78
- Figura 28:** Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *orange G* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).....79
- Figura 29:** Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *carmin* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).....79
- Figura 30:** Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *urucum* hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).....80

RESUMO

Este trabalho descreve a ação de dois fungos basidiomicetos, *Pleurotus sajor caju* (020) e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 na degradação dos corantes naturais urucum hidrossolúvel e carmim (ácido carmínico); como também a combinação destes com o corante urucum oleossolúvel; os corantes sintéticos *new coccine*, *orange G*, *chrome azurol S*; a combinação destes e o efluente da indústria de corantes naturais CHR HANSEN. Além disso, estudou-se o sistema ligninolítico envolvido nesses processos, a redução da demanda química de oxigênio (DQO) do efluente e dos meios de cultivo contendo os corantes, as análises de variações do pH, e do peso seco em relação ao tempo de crescimento. Os fungos foram crescidos em dois diferentes meios agitados: extrato de malte 0,5%, contendo 100 mg/L de corante e no efluente bruto. As análises dos caldos de cultivo foram realizadas no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º dias de crescimento. A descoloração dos meios de cultivos e do efluente foi verificada através de espectrofotometria de varredura, variando-se o comprimento de onda de 200 a 800 nm, e a degradação dos corantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todos os corantes foram descoloridos em alguma extensão pelos fungos estudados. A eficiência de remoção da cor variou de 50% a 100%. Ambos os fungos mostraram capacidade de descoloração, sendo que *Pleurotus sajor caju* (020) foi capaz de descolorir, eficazmente o efluente e os corantes naturais e sintéticos, individualmente ou em combinação. Não ocorreu descoloração do efluente por *Phanerochaete chrysosporium*, mas obteve-se excelente descoloração dos corantes naturais individualmente e dos corantes sintéticos individualmente ou em combinação.

ABSTRACT

This work describes the degradative action of two basidiomycetes, *Pleurotus sajor caju* (020) and *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, on the following natural or synthetic dyes: a) hydro-soluble annatto (norbixin) b) carmin (carminic acid); c) a combination of these with the fat-soluble annatto (bixin); d) new coccine; e) orange G; f) chrome azurol S; g) a combination of these synthetic dyes; h) effluent samples from the natural dye industry. In addition, the ligninolytic system involved in these processes and the reduction in the chemical oxygen demand (COD) of the effluent and of the cultivation medium containing dyes were studied. The fungi were grown in two different agitated media: 0.5% malt extract, containing 100 mg/L of different dyes, and in the raw industrial effluent. The cultivation broths were analysed for pH, mycelium dry weight and COD on the 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th and 12th days of growth. The decolorization of the culture media and effluent was verified using spectrophotometry, in the wavelength range 200 to 800 nm, and the degradation of the dyes was investigated using high performance liquid chromatography (HPLC). All the dyes were decolorised to some extent by the fungi studied with the efficiency of the color removal varying from 50 to 100%. *Pleurotus sajor caju* (020) was capable of efficiently decolorising the effluent and the natural and synthetic dyes, individually or in combination. Effluent decolorization was not observed with *Phanerochaete chrysosporium*, but this fungus showed an excellent decolorization action on the natural dyes individually and on the synthetic dyes individually or in combination.

I - INTRODUÇÃO

Há muitas décadas, produtos químicos industriais vêm sendo despejados no meio ambiente em grande escala. Muitos desses são rapidamente degradados por microrganismos do solo e da água, mas um considerável número vem se acumulando no meio ambiente, por lentidão dos processos de degradação. O acúmulo desses poluentes na biosfera pode criar um “stress” ecológico o qual é, freqüentemente, apontado como causa de contaminações prejudiciais à saúde humana.

Efeitos danosos aos organismos expostos às substâncias veiculadas pelos efluentes industriais e domésticos têm sido observados (CETESB, 1990). A poluição do meio ambiente, devido ao despejo de compostos fenólicos provenientes de operações industriais, tornou-se comum em todo o mundo (SAYADI & ELLOUZ, 1995). Os tratamentos convencionais de águas residuais como as lagoas aeradas e plantas de lodo ativado facilitam, mas não são capazes de remover completamente muitos dos poluentes orgânicos como, por exemplo, os corantes. Os compostos corantes são resistentes à degradação microbiana e possuem alta estabilidade em relação à luz, devido à natureza de suas estruturas geralmente contendo radicais aromáticos e heterocíclicos.

Alguns desses compostos apresentam toxicidade, podendo causar grandes prejuízos à saúde dos seres vivos quando acumulados no meio ambiente.

Embora os métodos para a redução da demanda biológica de oxigênio (DBO) da maioria dos efluentes sejam bem estabelecidos, os corantes são mais difíceis de serem tratados por causa de sua origem sintética e, principalmente, por serem estruturas moleculares aromáticas complexas. Tais estruturas são freqüentemente construídas para resistirem ao desbotamento, quando expostas ao sabão, água, luz ou agentes oxidantes. Essas qualidades, embora desejadas para a finalidade a que são propostas, tornam os corantes mais estáveis e menos disponíveis à biodegradação (BANAT *et al.*, 1996). A coloração do efluente está relacionada à DQO (demanda química de oxigênio), que representa a grandeza decisiva do resíduo orgânico nas águas servidas e a coloração é causada por parte desse resíduo.

A cor é o primeiro contaminante a ser reconhecido em resíduos aquosos e tem que ser removida antes de sua descarga em corpos d'água ou na terra, uma vez que a presença de quantidades muito pequenas de corantes na água (menos que 1 ppm para alguns corantes) é altamente visível e afeta o mérito estético, a transparência da água e a solubilidade dos gases em lagos, rios e outros corpos d'água.

Os poluentes ambientais, independente de sua origem química, sintética ou natural, são liberados no ambiente em consequência das atividades agroindustriais. Esses compostos são conhecidos como xenobióticos que, quando liberados no ambiente, podem ser degradados nas mais variadas velocidades, dependendo das condições químicas e físicas e da natureza dos microrganismos presentes. Podem, também, tornar-se imobilizados no solo ou acumular-se na cadeia alimentar. Existem dois processos básicos envolvidos na remoção de poluentes: degradação química e transformação biológica por ação microbiana (SEMPLE & FERMOR, 1995).

Desde muito tempo, os microrganismos são estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente. Os estudos de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes. A utilização de enzimas produzidas por microrganismos na degradação de xenobióticos recalcitrantes tem sido amplamente estudada nos últimos anos, mostrando-se ser um processo eficiente (VYAS & MOLITORIS, 1995; DEY *et al.*, 1994; OLLIKA *et al.*, 1993; DAVIS & BURNS, 1990).

Um dos materiais mais recalcitrantes e de difícil biodegradação é a lignina. Esse é o nome comum de um grupo de polímeros fenólicos, que associados com a hemicelulose e a pectina preenchem os espaços entre as

fibrilas de celulose da madeira. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam os fungos basidiomicetos, degradadores de lignina, como eficientes na degradação de grande variedade de compostos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (BARR & AUST, 1994). O problema da remoção da cor, em efluentes coloridos, tem encorajado a busca de alternativas de tratamentos biológicos para esse fim.

Os fungos que atacam a madeira e suas enzimas ligninolíticas possuem um grande potencial aplicativo podendo ser utilizados para o tratamento de materiais lignocelulósicos, biopolpação, descoloração de efluentes industriais, remoção de compostos clorados de águas residuais, etc., além de poderem degradar um grande número de poluentes orgânicos.

Os fungos ligninolíticos de decomposição branca, pertencentes à classe dos basidiomicetos e alguns ascomicetos, degradam preferencialmente a lignina da madeira, de maneira mais rápida e extensiva do que outros grupos de microrganismos. Eles invadem o lúmen das células vegetais, onde secretam enzimas que irão degradar a lignina e outros componentes (HATTAKA, 1994).

As atitudes de preservar e manter o equilíbrio ecológico caminham no sentido de aprimorar as tecnologias de tratamento. A degradação de corantes tem apresentado, nas últimas décadas, a tendência de busca de

esclarecimentos dos mecanismos enzimáticos apontando uma variedade de fungos que prometem “melhorar” o desenvolvimento de tratamentos eficazes (BUMPUS, 1995).

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Biodegradação de lignina e corantes

Um composto orgânico é descrito como sendo biodegradável, desde que possa ser transformado por microrganismos ou outros mecanismos biológicos resultando em mudanças e perdas nas características e propriedades químicas originais. Na biodegradação primária está envolvida somente uma mudança estrutural mínima na molécula original, podendo ou não alterar suas propriedades físicas e químicas. Para uma biodegradação aceitável é necessário que ocorra quebra do composto onde os produtos resultantes apresentam toxicidade mínima ou em concentrações abaixo das concentrações tóxicas. O ideal é a mineralização do composto a dióxido de carbono e água, portanto removendo-o completamente (SEMPLE & FERMOR, 1995).

Um dos compostos naturais mais recalcitrantes e de difícil biodegradação é a lignina. Quimicamente, a lignina é um polímero aromático tridimensional, composta de três diferentes tipos de álcoois p-hidroxicinâmílicos. A quantidade relativa desses álcoois é que determina o tipo de lignina e, desse modo, a rigidez do tecido vegetal (LEISOLA & FIECHTER, 1985).

No estudo da fisiologia e genética da degradação da lignina, o emprego de corantes em substituição a substratos radiomarcados revelou que a descoloração é consequência do metabolismo secundário do *Phanerochaete chrysosporium*, que ocorre paralelamente à degradação da lignina. Isto significa que o mesmo sistema de degradação da lignina é responsável pela descoloração, sugerindo a possibilidade de empregar-se os fungos da podridão branca no tratamento de resíduos das indústrias de fabricação e de utilização de corantes (GLENN & GOLD, 1983).

Os corantes são liberados no meio ambiente através dos efluentes provenientes de indústrias de alimentos, de corantes, de cosméticos, de fármacos e têxteis, as quais possuem como critério necessário para o uso desse produto a alta estabilidade à luz e à lavagem e que sejam resistentes ao ataque microbiano. Portanto, os corantes não são facilmente degradáveis e não são removidos da água através dos sistemas convencionais de tratamento de efluentes (CRIPPS *et al.*, 1990).

Os compostos corantes são usualmente aromáticos e heterocíclicos e freqüentemente recalcitrantes. Alguns deles são tóxicos e carcinogênicos, o que nos mostra a fundamental importância do desenvolvimento de métodos para a descolorização e degradação desses poluentes (VYAS & MOLITORIS, 1995).

Inúmeros trabalhos de degradação e descolorização de corantes por culturas ligninolíticas de fungos de decomposição branca têm sido reportados (GOSZCYNski *et al.*, 1994; HERNÁNDEZ *et al.*, 1994; OLLIKA *et al.*, 1993; PASTI-GRIGSBY *et al.*, 1992; SPADARO *et al.*, 1992). O envolvimento das enzimas manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) tem sido demonstrado no ciclo de degradação de alguns desses compostos (GOSZCYNski *et al.*, 1994; SPADARO & RENGANATHAN, 1992).

Em 1990, DAVIS & BURNS relataram a capacidade do fungo *Phanerochaete chrysosporium* de remover a cor e de degradar compostos tóxicos de efluentes fenólicos. Os fungos de decomposição branca, mais especificamente o basidiomiceto *P. chrysosporium*, têm sido amplamente estudados com relação à descoloração de efluentes (KATAGIRI *et al.*, 1995; SAYADI & ELLOUZ, 1995) e degradação de corantes (OLLIKA *et al.*, 1993; CRIPPS *et al.*, 1990; BUMPUS & BROCK, 1988).

YOUNG & YU (1997) compararam oito corantes (incluindo índigo, complexos metálicos, antraquinona e azo) e a descoloração causada por *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*. Os autores sugerem que vários fatores afetam a degradabilidade dos corantes nos sistemas fúngicos e verificaram que *P. chrysosporium* é um degradador versátil de corantes

sintéticos de várias estruturas químicas e que as ligninases e não peroxidases dependentes de manganês, catalisam estas reações. Além disso, concluíram que corantes com diferentes estruturas são descoloridos em velocidades diferentes e geralmente alta concentração do corante resulta em menor grau de descoloração.

Sendo o cultivo de cogumelos comestíveis um dos processos de bioconversão mais economicamente viáveis na utilização de resíduos lignocelulósicos, BUSWELL *et al.*, (1996) estudaram três tipos de cogumelos cultivados comercialmente (*Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* e *Pleurotus sajor caju*) os quais exibem habilidades variadas na utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato de crescimento. Uma avaliação das principais enzimas lignocelulolíticas envolvidas mostrou uma diversidade qualitativa entre esses cogumelos. *P. sajor caju* mostrou-se das três espécies a mais adaptada, podendo crescer numa grande variedade de resíduos agrícolas de diferentes composições em termos da razão entre polissacarídeo/lignina. Nas condições adotadas nesse estudo a MnP não se mostrou tão importante na degradação dos materiais quanto à lacase para o *P. sajor caju*; e nenhuma atividade de LiP foi detectada. No entanto, duas veratril oxidases parecem ter um papel importante na degradação da lignina.

Poucos autores têm estudado a habilidade de *Pleurotus sp* em degradar poluentes recalcitrantes. RAJARATHANAN & BANO (1989) apontaram que fungos desse gênero apresentam duas vias de degradação de lignina e compostos semelhantes a ela: (1) ocorre demetilação anterior à abertura do anel aromático, (2) abertura do anel aromático já em primeira instância. O fungo *Pleurotus flabellatus* produz reação colorida com os compostos fenólicos e causa descoloração em corantes poliméricos. Essa atividade relaciona-se ao sistema de enzimas oxidativas do tipo lacase.

O sistema enzimático ligninolítico produzido por fungos de decomposição parda, como o *Polyporus ostreiformis*, também foi relacionado com a degradação de corantes tais como vermelho do congo e azul de metileno (DEY *et al.*, 1994).

2.2- Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos

O sistema enzimático ligninolítico produzido por fungos é oxidativo e envolve enzimas como: LiP, MnP, lacase e enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, as quais são capazes de agir extracelularmente em materiais com solubilidade limitada.

A natureza irregular e recalcitrante da lignina e o fato de que ela contém subestruturas compostas de poluentes como os fenóis, anisóis, bifenis e diariléteres levou os pesquisadores a postularem que o sistema enzimático ligninolítico não específico produzido pelos fungos de decomposição branca deveria ser capaz de degradar oxidativamente alguns poluentes aromáticos persistentes (SAYADI & ELLOUZ, 1995).

O fungo basidiomiceto de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium* tem sido utilizado como um sistema modelo para o estudo da biodegradação da lignina, bem como para o estudo da degradação de compostos poluentes orgânicos como pesticidas, corantes, clorofenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc. Entretanto, ele não é o único fungo capaz de degradar a lignina, uma vez que não é o único a possuir um sistema enzimático ligninolítico (ORTH *et al.*, 1993).

A produção das enzimas ligninolíticas em *P. chrysosporium* e outros fungos de degradação branca ocorre durante o metabolismo secundário em resposta à depleção de nutrientes como nitrogênio, carbono ou enxofre (GOLD & ALIC, 1993). O fungo *P. chrysosporium* é capaz de metabolizar preparações de lignina apenas quando uma fonte alternativa de carbono está presente (LEATHAM, 1986); portanto, a degradação da lignina depende da

presença de um co-substrato rapidamente metabolizável como, por exemplo, a glicose (DE JONG *et al.*, 1994).

2.2.1 Lacase (EC 1.10.3.2)

Esta enzima é uma polifenoloxidase que contém em geral 4 átomos de cobre no seu sítio ativo por molécula, a qual utiliza oxigênio molecular como oxidante (ERIKSSON *et al.*, 1990), oxidando fenóis e polifenóis através da remoção de um elétron, com a formação de radicais fenóxi. Esses radicais podem ser convertidos em quinonas através de uma segunda catálise ou de reações não enzimáticas espontâneas (THURSTON, 1994; HIGUCHI, 1990).

A lacase fúngica aparentemente pode polimerizar, despolimerizar e desmetilar compostos fenólicos *in vitro* (BOURBONNAIS & PAICE, 1990; KERSTEN *et al.*, 1990). Entretanto, a função fisiológica dessa enzima não foi esclarecida e seu papel na biodegradação da lignina ainda é incerto (HATAKKA, 1994).

A lacase extracelular é tipicamente produzida pelos fungos de decomposição branca (HATAKKA, 1994). Alguns ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos foram reportados como fungos produtores de lacase (MAYER, 1987). Recentemente duas isoenzimas (L1 e L2) isoladas do

fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* caracterizadas como lacase foram purificadas. L1 e L2 apresentaram ponto isoelétrico de 3,4 e 4,8 e massa molecular de 71.000 Da e 68.000 Da, respectivamente (FUKUSHIMA & KIRK, 1995).

2.2.2 Peroxidases

As peroxidases são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos. O ferro contido na enzima é oxidado na presença de peróxido de hidrogênio, formando um composto de alta capacidade oxidativa. Esse composto sofre redução *via* transferência de um elétron, oxidando fenóis ou aminas aromáticas, os quais atuam como doadores de elétron (SZKLARZ *et al.*, 1989).

Os fungos ligninolíticos produzem 2 tipos especiais de peroxidases: lignina peroxidase e manganês peroxidase.

2.2.2.1. Lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

A LiP e suas isoenzimas apresentam ponto isoelétrico variando de 3,3 a 4,7 e massa molecular de 38.000 a 43.000 Da (REDDY & D'SOUZA,

1994). A lignina peroxidase (LiP) foi descoberta em 1983 por pesquisadores trabalhando com *Phanerochaete chrysosporium*. Eles conseguiram isolar uma enzima extracelular dependente de H_2O_2 , responsável pela catálise de reações capazes de despolimerizar parcialmente a lignina (KIRK & TIEN, 1983; TIEN & KIRK, 1983). Essa enzima é uma glicoproteína que contém 1 mol de Fe protoporfirínico IX, por mol de enzima (GOLD *et al.*, 1989).

A LiP catalisa a oxidação de compostos modelo de lignina preferencialmente não fenólicos, podendo oxidar, também, compostos fenólicos, através de uma simples reação inicial de remoção de um elétron do núcleo aromático, produzindo radicais cátions arila os quais, através de reações não enzimáticas, darão origem a uma série de produtos finais, resultando no rompimento do polímero (GOLD & ALIC, 1993). O ferro contido no grupo heme passa por 5 estados de óxido-redução durante o ciclo catalítico normal da enzima, podendo originar três tipos de compostos (Figura 1).

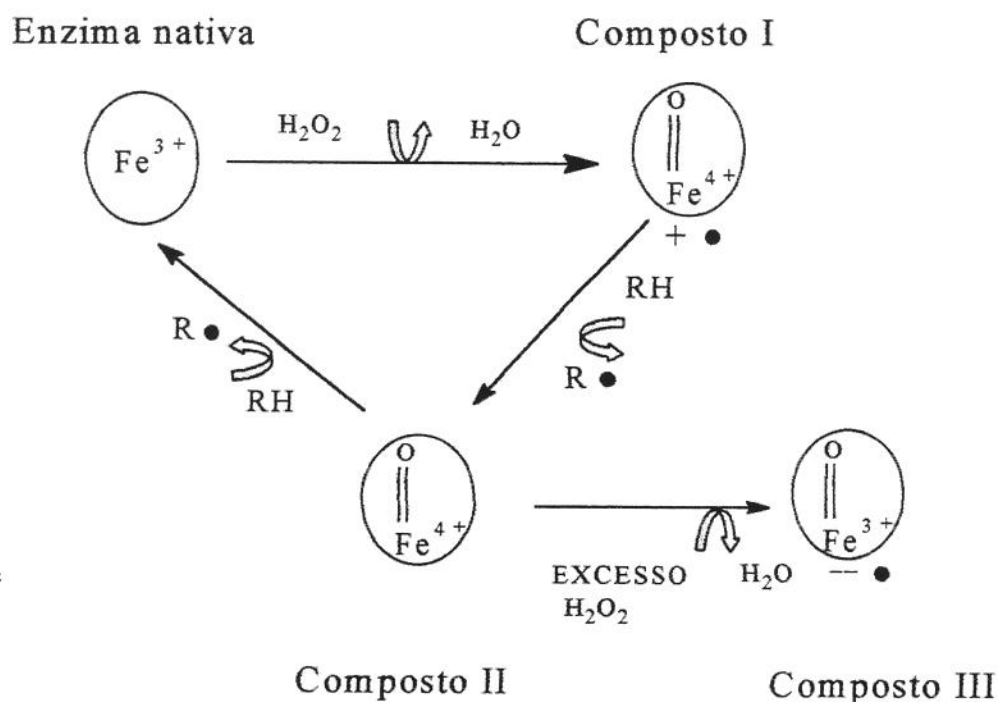


Figura 1: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). RH: substrato da enzima na forma reduzida; $\text{R}\bullet$: forma radicalar oxidada (GOLD et al. 1989).

O composto I é produto da reação primária da enzima com H_2O_2 , onde o Fe (III) da enzima nativa é oxidado a Fe (IV). A redução desse composto, *via* transferência de um elétron, resulta na formação do composto II, que pode ser reduzido também pela transferência de um elétron, retornando a enzima ao seu estado nativo, ou poderá formar o composto III, se for oxidado pelo H_2O_2 na ausência de um substrato redutor. O composto III é uma forma enzimática com capacidade catalítica limitada e pode ser rapidamente inativado pelo excesso de H_2O_2 (SCHOEMAKER *et al.*, 1994; BARR & AUST, 1994; GOLD & ALIC, 1993).

2.2.2.2 Manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.7)

A manganês peroxidase (MnP) pertence a um grupo de isoenzimas apresentando ponto isoelétrico entre 4,2 a 4,9 e massa molecular de 45.000 a 47.000 Da (GOLD & ALIC, 1993), as quais são responsáveis pela catálise da oxidação de uma variedade de fenóis, aminas e corantes (PASZCYNski, *et al.*, 1985; GLENN & GOLD, 1985). A atividade de MnP foi descoberta por KUWAHARA *et al.*, (1984) no meio extracelular de crescimento de culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. A MnP também é uma glicoproteína contendo como grupo prostético Fe protoporfirínico IX, dependente de H_2O_2 e íons Mn (II), sendo produzida junto com a LiP durante o metabolismo secundário (BUSWELL & ODIER, 1987).

O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao da LiP, envolvendo a formação de três compostos (Figura 2). O composto I é formado através da oxidação do Fe (III) para Fe (IV) na presença de H_2O_2 . A redução desse composto, *via* transferência de um elétron, formará o composto II, que por sua vez poderá transformar-se em enzima nativa tendo como participação íons Mn (II), ou formar o composto III em excesso de H_2O_2 . Os íons Mn (II) atuam como doadores de elétron e os íons Mn (III) são estabilizados por quelação,

atuando como mediador redox na formação de radicais fenoxila (DE JONG *et al.*, 1994; WARIISHI *et al.*, 1992; AITKEN & IRVINE, 1990).

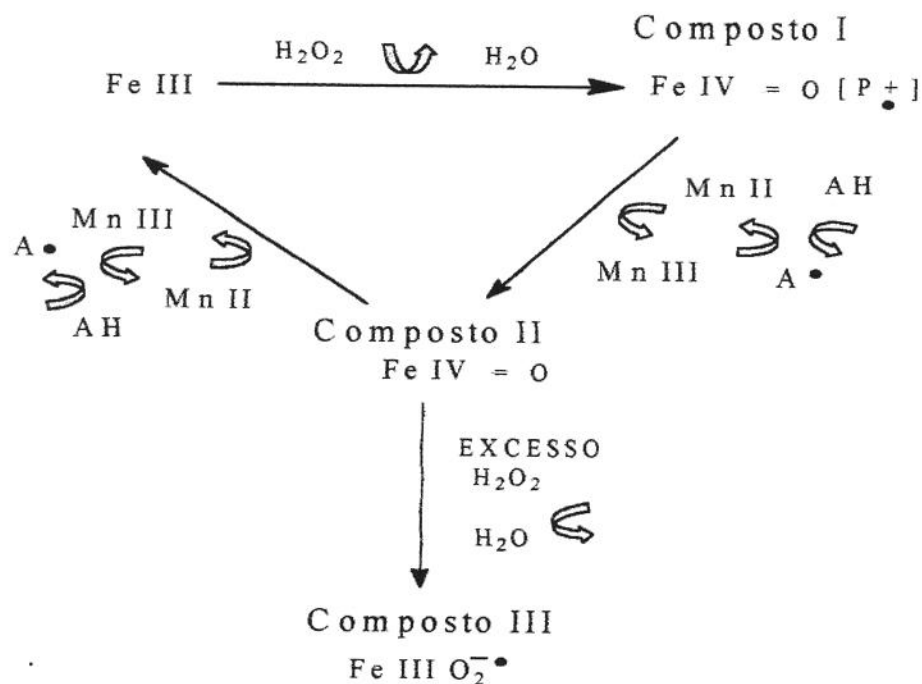


Figura 2: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP). AH: substrato da enzima; $\text{A}^\bullet$: forma radicalar oxidada (GOLD *et al.* 1989).

2.2.3 - Álcool veratrílico oxidase (AVO)

Em adição às peroxidases e lacase, os fungos de decomposição branca produzem uma variedade de oxidases capazes de gerar H_2O_2 . A produção dessas enzimas, provavelmente, deve estar relacionada com a utilização do H_2O_2 por peroxidases extracelulares durante a degradação da

lignina. Estas oxidases incluem, entre outras, a álcool veratrílico oxidase (GOLD & ALIC, 1993).

A enzima álcool veratrílico oxidase é uma aril álcool oxidase que cataliza a oxidação de álcoois insaturados aos seus aldeídos correspondentes, com a redução de O_2 a H_2O_2 . Esta enzima tem sido identificada em culturas que estão em estágio de crescimento avançado, quando a *via* metabólica secundária é presumivelmente iniciada (MARZULLO *et al.*, 1995).

Estudos anteriores demonstraram que a enzima AVO é capaz de reduzir quinonóides ou radicais gerados durante a degradação da lignina pela atuação principalmente da lacase. Portanto, além de produzir H_2O_2 utilizado pelas peroxidases, a AVO deve estar relacionada com a prevenção da polimerização de derivados de baixos pesos moleculares durante a degradação da lignina (MARZULLO *et al.*, 1995).

2.3- Corantes: utilização e problemas ecológicos decorrentes do seu uso

De acordo com a fonte de produção, os corantes dividem-se em naturais e artificiais (sintéticos), sendo que os naturais podem ser de origem vegetal, mineral e animal.

Do ponto de vista químico, corantes são substâncias que têm em comum um grupo aromático. Em sentido amplo, o termo corante designa toda e qualquer substância que dá cor, colore, tingem, pinta. São produtos intensamente empregados para a coloração de vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, materiais têxteis, nos quais são retidos por adsorção física, formação de soluções, sais ou complexos com metais, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (CONTATO, 1995).

Sabe-se que 87% das percepções sensoriais captadas pelos seres humanos ocorrem através da visão; 9% pela audição; e os demais 4% pelo conjunto de olfato, paladar e tato. A cor é um fenômeno psicofísico, levando a declinar as preferências nas mais diferentes situações ou ocasiões do cotidiano (NAZARÉ, 1998).

A primeira característica que é notada em um alimento é a sua coloração e isto predetermina nossas expectativas com relação ao sabor e à qualidade. O melhor alimento com um perfeito balanço de nutrientes torna-se inútil se não for consumido. Conseqüentemente, o alimento precisa ser atrativo. A adição de corantes aos produtos alimentícios é efetivada com os seguintes propósitos: reforçar a coloração já presente no alimento mas menos intensa do que o consumidor espera; assegurar a uniformidade da cor do alimento nos diferentes lotes processados; restaurar a aparência original do alimento cuja cor foi afetada durante processamentos e fornecer cor a certos alimentos como balas, doces, sorvetes e algumas bebidas (HENDRY & HOUGHTON, 1992).

A produção e utilização industrial de pigmentos e corantes sintéticos é um problema delicado especialmente em virtude de sua difícil degradação. O despejo desses resíduos pode interferir na transmissão da luz solar, prejudicando a fotossíntese e reduzindo a produtividade da comunidade aquática; prejudicar a aparência visual e o valor recreacional através da alteração da cor natural; interferir nos sistemas de tratamento de águas de abastecimento doméstico e industrial, elevando o custo do tratamento. Os grupos cromóforos podem formar complexos com íons metálicos como ferro e cobre, removendo estes metais que são importantes no metabolismo de certos

organismos aquáticos; a cor em cursos de água pode afetar o movimento dos peixes e a produtividade dos mesmos (CAMMAROTA, 1991). Desta forma, é preciso muita atenção em torno dos métodos de descarte de contaminantes e de manipulação destes materiais.

Os corantes artificiais, que não ocorrem na natureza e são produzidos através de sínteses químicas, apesar de serem utilizados em pequenas quantidades, apresentam toxicidade, além de serem poluentes orgânicos altamente resistentes. Os corantes mais comuns e utilizados são os classificados como azo e triarilmetano (PASZCZYNSKI *et al.*, 1992; LLEWELLYN, 1998).

O uso de corantes naturais é largamente permitido em todo o mundo e, embora eles não sejam particularmente tóxicos, são considerados como problema de poluição (CRIPPS *et al.*, 1990). No Brasil, aproximadamente 35 corantes naturais são permitidos em alimentos e bebidas.

Os corantes naturais mais utilizados nas indústrias de alimentos são: urucum, carmim, cúrcuma, vermelho de beterraba, páprica, antocianina e clorofila. Os extratos do corante urucum (Figura 3), classe carotenóide, são os produtos oleosos ou alcalinos obtidos por remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum (*Bixa orellana L.*) por vários processos. São apresentados em três formas: a) extrato lipossolúvel apresentando cor

vermelha a castanho-avermelhada, no qual a bixina é o princípio ativo; b) extrato hidrossolúvel de cor castanho-avermelhada a castanho, no qual a norbixina é o princípio ativo; c) pigmento bruto apresentando-se como um pó vermelho escuro (TAKAHASHI, 1987).

A substância corante, extraída das sementes do urucum, após ser submetida à ação de processos químicos, tem larga aceitação nos mercados nacional e internacional, podendo ser utilizada basicamente nas indústrias alimentícias de laticínios (queijo, manteiga, margarina, creme), de panificação (pão, biscoito, macarrão, bolo), de bebidas (cervejas, refrigerantes, vinhos, licores), condimentos (colorau) e frigoríficas (carnes, embutidos, salsichas). Os produtos derivados (corantes) do urucum, podem ainda ser utilizados nos seguintes gêneros industriais: cosméticos (bronzeadores, loções, cremes), farmacêutica (remédios líquidos e sólidos), madeireira (corante, verniz, cera), têxtil (corante para tingir tecidos), cromatografia (tela, película, filme), tintas (nitrocelulose, óleo, esmalte).

Os corantes que têm por estrutura básica a antraquinona (Figura 3), são os mais resistentes à degradação devido a suas estruturas aromáticas fundidas, que permanecem coloridas por longos períodos de tempo (BANAT *et al*, 1996). Um exemplo desses corantes é o carmim, também conhecido como laca de alumínio ou cálcio-alumínio, obtido do extrato aquoso da

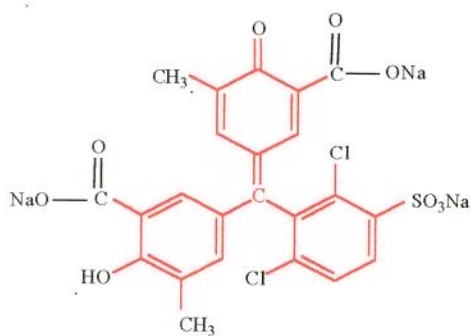
cochonilha. Denomina-se cochonilha aos corpos dessecados de fêmeas de insetos *Dactylopius coccus costa* (*Coccus cacti* L.). É apresentado na forma de pó friável (vermelho ou vermelho escuro), ou solução de cor vermelho violácea (TAKAHASHI, 1987). O princípio ativo é o ácido carmínico e suas principais aplicações são em laticínios, doces, geléias, sorvetes, bebidas alcoólicas e cosméticos.

Os corantes de origem sintética apresentam diversas vantagens em relação aos corantes naturais. São melhor definidos quimicamente, possuem maior poder de tingimento, incorporam-se facilmente a produtos alimentícios e, conseqüentemente, são utilizados em concentrações menores. Além disso, podem ser facilmente padronizados e obtidos em seu estado puro (CROSBY, 1984).

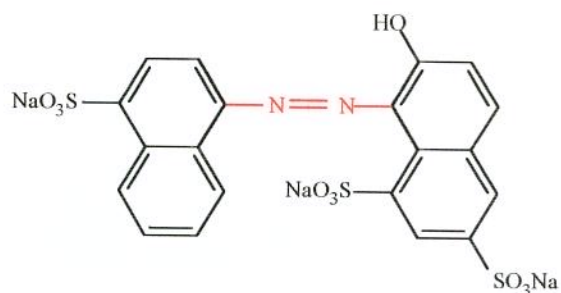
Os corantes azo (Figura 3) são empregados para colorir e estampar fibras têxteis naturais e sintéticas, couro, forrações, papel, etc. Esse é o maior grupo de corantes sintéticos liberados no ambiente e não são prontamente degradados nos sistemas de tratamento biológico, o que os torna um problema ambiental significativo nos locais onde são fabricados e usados. Contaminam, com seus efluentes e lodos residuais, os rios e terrenos onde os lodos são dispostos, causando, por exemplo, inibição da fotossíntese superficial nos rios

e coloração dos lençóis freáticos (BUMPUS, 1995). Fazem parte desse grupo os corantes *new coccine* (acid red 18) e *orange G* (acid orange 10).

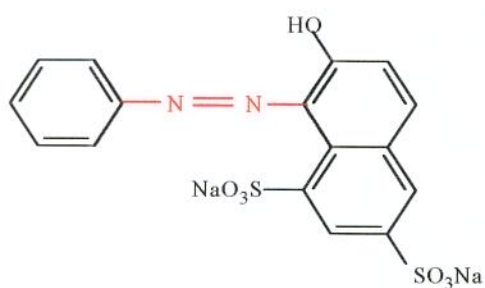
Alguns corantes requerem a presença de um metal para conferir cor. Esses são chamados de corantes mordentes. Um exemplo é o *chrome azurol S* (mordant blue 29) (Figura 3), pertencente à classe triarilmetano, que se caracteriza pela presença de três anéis aril em sua estrutura (LLEWELLYN, 1998). É muito utilizado para determinação de fluoreto. Os corantes complexados com metais, tais como aqueles a base de cromo, podem liberar esse metal, que é carcinogênico, nos suprimentos de água naturais.

**Chrome Azurol S**Fórmula química $C_{23}H_{13}Cl_2O_9SNa_3$

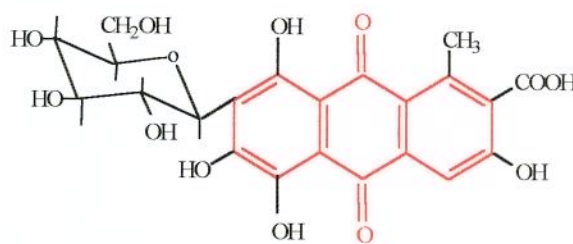
PM 605.29

**New Coccine**Fórmula química $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$

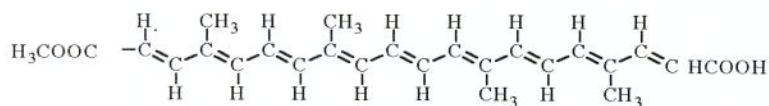
PM 604.5

**Orange G**Fórmula química $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$

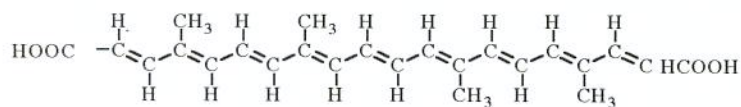
PM 452.38

**Ácido Carmínico**Fórmula Química $C_{22}H_{20}O_{13}$

PM 492.40

**Bixin a** $C_{25}H_{30}O_4$

PM 394.50

**Norbixin a** $C_{24}H_{28}O_4$

PM 380.48

Urucum (*Bixa orellana* Linnaeus)**Figura 3:** Fórmulas estruturais, químicas e pesos moleculares dos corantes utilizados.

III - OBJETIVOS

* Selecionar os fungos basidiomicetos capazes de degradar os corantes naturais urucum hidrossolúvel e carmim (ácido carmínico); como também a combinação destes com o corante urucum oleossolúvel; os corantes sintéticos *new coccine*, *orange G*, *chrome azurol S*; a combinação destes e o efluente da indústria de corantes naturais CHR HANSEN.

* Estudar a biodegradação dos corantes naturais e sintéticos com relação: ao sistema enzimático ligninolítico, a redução da demanda química de oxigênio (DQO) do efluente e dos meios de cultivo contendo os corantes; além de verificar as variações do pH, e do peso seco em relação ao tempo de crescimento.

* Verificar a descoloração dos meios de cultivo através de espectrofotometria de varredura, e a degradação dos corantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Materiais

4.1.1 – Microrganismos

Foram utilizadas 5 linhagens de fungos basidiomicetos produtores de enzimas ligninolíticas: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus sajor caju* (020), *Pleurotus sajor caju* (016), *Pleurotus florida*, *Pleurotus sp*, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. Estes foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio Potato Dextrose Ágar (PDA).

4.1.2- Meios de crescimento

Dois meios de cultivos diferentes foram preparados no laboratório utilizando corante como fonte de carbono: *New coccine*; ou *Orange G*; ou *Chrome azurol S*; ou Combinação desses corantes sintéticos (combinação

sintética); ou Carmim; ou Urucum hidrossolúvel; ou Combinação desses corantes naturais (combinação natural).

Meio 1: Extrato de malte 0,5% (p/v), corante na concentração final de 100mg/L.

Meio 2: fosfato de amônia monobásico (0,5g/L), fosfato de potássio monobásico (0,8g/L), fosfato de potássio dibásico (0,3g/L), sulfato de magnésio (0,3g/L), sulfato de zinco (4,0mg/L), sulfato de manganês (5,0mg/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,06g/L), extrato de levedura (0,2g/L), sulfato de ferro III (10 ug/L), corante na concentração final de 100mg/L.

Após a esterilização do meio, adicionou-se 0,5 mL de tiamina, na concentração de 10mg/L. A tiamina foi esterilizada em membrana Millipore (0,22 μ m) e guardada em geladeira a 16°C.

Meio 3: Efluente bruto da indústria de corantes naturais CHR HANSEN, situada em Valinhos no estado de São Paulo, devido à presença dos corantes naturais urucum e vermelho de cochonilha.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos à 121°C.

4.1.3- Equipamentos

- Agitador magnético (Tecnal);
- Agitador rotatório com câmara climática (New Brunswick Scientific);
- Aquecedor para DQO (JTORIKA – Dry Block BATH MG-1);
- Banho-maria, marca Eyela, modelo SB-650;
- Câmara de fluxo laminar, marca Veco;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência marca Shimadzu, modelo LC – 6A, equipado com detector ultravioleta modelo SPD-6A, integrador modelo C-R4A e coluna cromatográfica Cosmosil – nº 390-47 C₁₈ fase reversa (4.6 x 150 mm);
- Espectrofotômetro marca HACH, modelo DR/2010;
- Espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo UV - 1201;
- Filtros para fase móvel, marca Millipore;
- Ultra purificador de água para uso em cromatografia líquida de alta eficiência, marca Milli-Q Plus; Micropipetadores com volumes reguláveis, marca Gilson;
- Equipamentos de uso comum de laboratório: autoclave, balança analítica, estufas, pHmetro, etc.

4.1.4- Reagentes e materiais específicos

Para Análise:

- peróxido de hidrogênio;
- álcool veratrílico;
- lactato de sódio;
- sulfato de manganês;
- albumina bovina;
- vermelho de fenol;
- hidróxido de sódio;
- ácido cítrico;
- fosfato sódico;
- o-dianisidina;
- siringaldazina;
- etanol;
- vários solventes (Merck, Synth, Sigma, Mallinckrodt).

Tampões:

- tampão tartarato de sódio;
- tampão citrato fosfato;
- tampão succinato de sódio (Merck, Synth, Sigma).

Corantes (utilizados na concentração final de 100 mg/L):

- corantes naturais urucum hidrossolúvel A-260-WS (0,35 – 1,12% norbixina), oleossolúvel A-230-OS (0,23% bixina) e carmim CC-330-WS (1,0 – 4,0% ácido carmínico), produzidos pela indústria de corantes naturais CHR HANSEN. O corante urucum oleossolúvel foi utilizado apenas em combinação com urucum hidrossolúvel e carmim;
- corantes sintéticos *new coccine* (acid red 18; C.I. 16255- Aldrich), *orange G* (acid orange 10; C.I. 16230- Aldrich), *chrome azurol S* (mordant blue 29; C.I. 43825- Aldrich), e a combinação desses três corantes.

Alguns reagentes utilizados neste trabalho apresentavam grau analítico e outros grau cromatográfico.

4.2- Métodos

4.2.1- Inoculação dos microrganismos

Para estudos de crescimento, os microrganismos foram transferidos com auxílio de alça de platina, para placas de Petri contendo meio PDA. Após as linhagens preencherem toda a superfície da placa, foram recortadas pequenos quadrados de 1,0 x 1,0 cm de ágar contendo massa celular. Tanto

para os estudos dos meios preliminares de descoloração, como na etapa posterior para verificar a produção enzimática, oito quadrados foram utilizados como inóculos, tomando-se os devidos cuidados evitando-se ao máximo que o ágar das placas também fosse transferido, o que poderia ocasionar um crescimento devido a nutrientes provenientes do meio sólido. Todos os experimentos foram desenvolvidos em triplicata sendo três erlenmeyers com inóculo (amostras) e um sem inóculo (controle).

4.2.2 - Ensaio preliminar de descoloração

As cinco linhagens de microrganismos citadas no item 4.1.1, foram inoculadas de acordo como descrito em 4.2.1, em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de meio de crescimento 1 ou 2 acrescido de corante a 100mg/L, em pH 4,8 e incubados a 30°C (exceção ao *P. chrysosporium* – 37°C), sem agitação, e a descoloração observada visualmente. Os mesmos procedimentos foram, posteriormente, repetidos com agitação dos frascos a 100 rpm. De cada situação experimental, foram inoculados 24 frascos, sendo 4 retirados para análise à cada 2 dias (três frascos/amostra e um controle), até completar o período de 12 dias de crescimento.

4.2.3 - Coleta e caracterização das amostras do efluente

Amostras do efluente foram colhidas em frascos plásticos limpos, num volume de cinco litros, na entrada do efluente para o tratamento. Após a coleta, o efluente foi caracterizado quanto ao pH e DQO, realizada de acordo com o item 4.2.4.

A intensidade da coloração do efluente bruto foi analisada logo após a coleta, através de espectrofotometria de varredura com o comprimento de onda, variando de 200 a 800 nm.

4.2.4 - Determinação da DQO

É a quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica.

O efluente, foi submetido a análises de determinação da DQO, antes e após o crescimento microbiano, enquanto o meio 1 foi analisado apenas após o crescimento. As análises foram desenvolvidas de acordo com a metodologia especificada no catálogo do aparelho DR/2010 (HACH), tendo sido utilizadas alíquotas de 1 mL das amostras, 0,02g de AgSO_4 , 0,5 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1,5 mL de H_2SO_4 concentrado. As reações se desenvolveram a 150°C. Para facilitar a

leitura foi adicionado 2,9 mL de água destilada após o resfriamento. Água destilada também foi utilizada como branco. Ao fim de 2 horas nesta temperatura, os frascos foram retirados e a leitura foi feita a 600 nm.

Os valores de porcentagem de redução da DQO foram determinados através da comparação dos resultados, entre o controle e as amostras, encontrados a partir das medidas feitas no espectrofotômetro.

4.2.5 - Caracterização do efluente

O efluente bruto foi caracterizado em alguns parâmetros físico-químicos, após sua coleta: potencial hidrogeniônico (pH), DQO e espectrofotometria de absorção, variando o comprimento de onda de 200 a 800 nm.

4.2.6 – Determinação do peso seco e variação do pH

Após o período estipulado para o crescimento, a massa micelial foi separada dos caldos de cultura por filtração em algodão, com peso úmido e seco, previamente determinados e levado à estufa a 105°C. Tal operação foi repetida até obtenção de peso constante, de acordo com a metodologia descrita

por WASHINGTON, 1975. O pH do filtrado foi novamente determinado e os caldos mantidos congelados (-20°C), para posterior determinação de atividade enzimática e verificação da degradação dos corantes.

4.2.7 – Atividades enzimáticas desenvolvidas nos meios de cultivo

As atividades das seguintes enzimas ligninolíticas foram determinadas a partir do cálculo da diferença de absorbância, medidas espectrofotometricamente e todos os resultados foram expressos em UI/L ($\mu\text{moles produto/min.L}$).

- Lignina Peroxidase (LiP): A atividade LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico seguindo a metodologia citada por TIEN & KIRK, 1984. A mistura da reação continha 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de uma solução de álcool veratrílico $0,2\text{mmol.L}^{-1}$ em tampão tartarato de sódio $0,4\text{mol.L}^{-1}$ (pH 3,0). A reação iniciou-se com adição de H_2O_2 e determinou-se a absorbância a 310nm em 0 e após 10 minutos.

- Álcool Veratrílico Oxidase (AVO): A atividade da AVO foi determinada quase da mesma maneira que para LiP sendo que o H_2O_2 foi

substituído do meio de reação por H₂O destilada. Colocou-se 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de álcool veratrílico em tampão tartarato de sódio e 0,2mL de água destilada. Mediu-se a atividade a 310nm.

- Manganês Peroxidase (MnP): A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol, como descrito por KUWAHARA *et al.*, (1984) e a leitura da absorbância efetivada a 610 nm.

- Lacase: A determinação da atividade lacase foi efetivada utilizando-se siringaldazine e o-dianisidina como substratos, de acordo com SZKLARK *et al.*, (1989) com ligeiras modificações, e a leitura da absorbância feita a 525 nm.

- Peroxidases: Para as peroxidases a determinação foi feita da mesma forma que para lacase, exceto que 0,1 mL de H₂O₂ foi introduzido no meio de reação no lugar da H₂O destilada, como proposto por SZKLARK *et al.*, (1989).

4.2.8 - Verificação da degradação dos corantes

O meio 1 contendo o corante urucum hidrossolúvel; carmim; combinação desses com urucum oleossolúvel; *new coccine*; *orange G*;

chrome azurol S; combinação desses e o efluente, foram analisados por espectrofotometria para a verificação da descoloração, variando o comprimento de onda de 200 a 800 nm, para as determinações enzimáticas, e determinação da DQO. A degradação dos corantes presentes no meio 1 foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se uma curva padrão obtida para cada corante nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 125 mg/L (anexos 1).

Para a separação isocrática dos corantes, foram utilizadas diversas fases móveis e comprimentos de onda para a detecção. Em relação ao corante urucum hidrossolúvel, foi empregada uma mistura de água e tetrahydrofurano 58/42 (v/v) de acordo com ROUSEFF (1988) e detecção à 350 nm. A fase móvel usada para a eluição do corante carmim consistiu de uma combinação de 19% de acetonitrila e 81% de ácido fórmico (1,19 mM) e detecção à 280 nm (JALÓN *et al.*, 1989); para os corantes *new coccine* e *orange G* foi utilizado um sistema de solventes composto por tampão fosfato 75 mM pH 6.7 e metanol na proporção de 3:1 como descrito por ZGHAL *et al.*, (1995); e para o corante *chrome azurol S*, foi utilizada uma mistura de metanol e água na proporção de 1:1. A detecção para esses três corantes sintéticos foi verificada à 307 nm e, para todos os corantes, a velocidade da vazão foi fixada em 0,5 mL/minuto.

V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papel dos microrganismos da água e do solo na degradação de compostos orgânicos é de inegável relevância. A mineralização ou completa degradação de compostos químicos sintéticos é sempre consequência da atividade microbiana. Poucos mecanismos abióticos convertem totalmente os compostos orgânicos no mesmo grau e complexidade de transformações conseguida pelos microrganismos. Entretanto, para ocorrer a biodegradação de moléculas e compostos é necessário um sistema enzimático ativo. Se as enzimas não estão envolvidas na conversão das moléculas e não há uma via bioquímica eficiente, não é possível a ação biológica.

A biodegradação só pode ocorrer quando o substrato e os sítios reativos entram em contato. O sistema ligninolítico dos basidiomicetos possui grande variedade de enzimas extracelulares que agem sobre o corante adsorvido à hifa ou quando dissolvido no meio aquoso.

Os fatores que podem influenciar a degradação e sua variabilidade entre espécies idênticas ou diferentes relacionam-se às características genéticas das espécies/linhagens, ao pH, oxigenação, temperatura e presença de nitrogênio e minerais (VYAS *et al.*, 1994; KEREM & HADAR, 1995; TUOR *et al.*, 1995).

Neste trabalho foi mostrada a habilidade de dois fungos de degradação branca em descolorizar e degradar os corantes sintéticos *chrome azurol S* (CAS), *new coccine* (NC), *orange G* (OG), a combinação destes (MS); os corantes naturais carmim (C), urucum hidrossolúvel (UH), a combinação destes (CN) e o efluente (EF).

5.1- Seleção dos basidiomicetos capazes de degradar os corantes

Com os resultados obtidos nos experimentos descritos no item 4.2.2, escolheram-se os melhores fungos, o melhor meio de cultivo e a melhor condição de crescimento. Em concordância com SANI *et al.*, 1998, reconheceu-se em nossos resultados que quando os fungos *P. chrysosporium* e *P. sajor caju* (020), nesta ordem, na condição de crescimento agitado em meio formulado com extrato de malte demonstraram maior capacidade de descoloração e, em menor tempo. Desta forma, para a sequência do trabalho, optou-se por estes microrganismos inoculados no meio 1 e no efluente, sob agitação e pH corrigido para 4,8, utilizando-se, também, os mesmos parâmetros experimentais (periodicidade de análises e tempo de crescimento).

5.2 - Características do efluente

As análises do efluente bruto mostraram os valores: pH = 11,04; e DQO = 664 mg/O₂ /L. O espectro de absorção do efluente bruto pode ser visualizado na **Figura 4**.

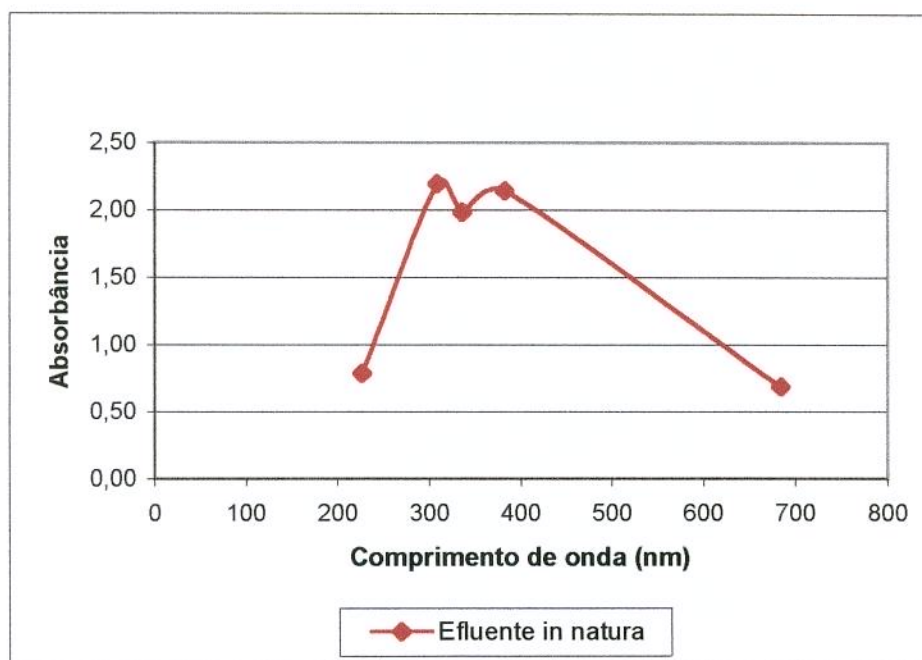


Figura 4: Espectro de absorção do efluente bruto.

5.3- Determinação do peso seco

Segundo LEISOLA & FIECHTER (1985), *Phanerochaete chrysosporium* é um dos mais potentes organismos ligninolíticos disponíveis, sendo o mais estudado. Ele apresenta formação de conídios na fase assexual em abundância e seu ciclo reprodutivo é rápido. Possui como característica,

crescimento rápido, o que foi confirmado neste trabalho. Em relação às espécies comestíveis de *Pleurotus*, essas vem sendo largamente estudadas devido a habilidade de crescerem numa ampla variedade de materiais lignocelulósicos (RAJARATHANAM & BANO, 1989).

Nesse estudo, tanto *Phanerochaete chrysosporium* quanto *Pleurotus sajor caju* (020) cresceram satisfatoriamente em todos os meios de cultivo. Como pode ser observado nas **Figuras 5 e 6**, a determinação do peso seco dos fungos cultivados no meio 1 mostrou curvas de crescimento similares. Entretanto, com desempenho levemente superior do *Pleurotus sajor caju* (020) em todos os corantes. O maior peso seco de *Pleurotus sajor caju* (020) foi obtido no meio 1, contendo a combinação de corantes naturais. Já no efluente o crescimento de ambas as linhagens foi semelhante. Tais resultados caminham paralelamente aos citados por RAJARATHANAM & BANO, 1989, ao mencionar o crescimento de *Pleurotus sp* em diferentes materiais lignocelulósicos, com configurações moleculares tão complexas quanto à dos corantes ora utilizados.

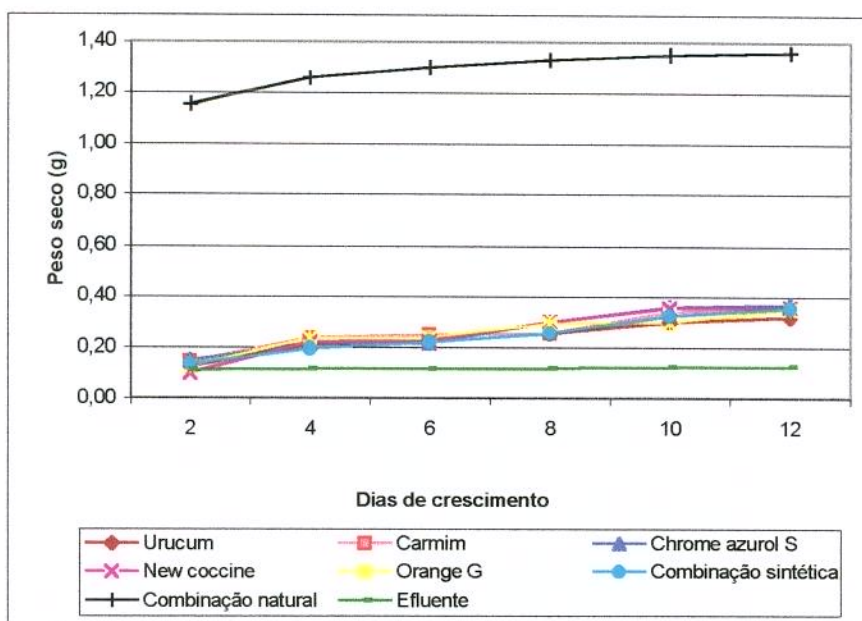


Figura 5: Peso seco de *Pleurotus sajor caju* (020) em 50 mL de meio de cultivo durante 12 dias de crescimento.

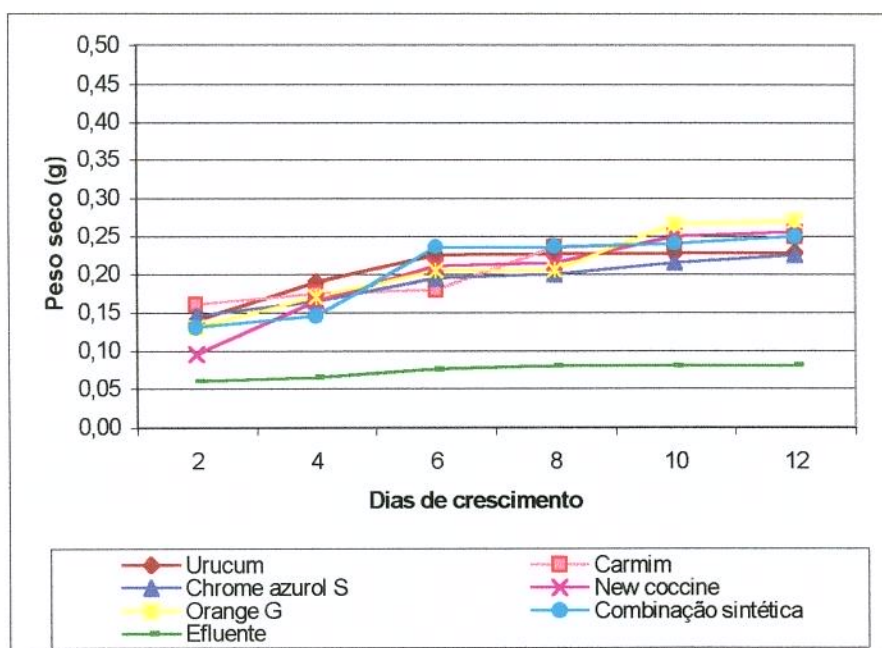


Figura 6: Peso seco de *Phanerochaete chrysosporium* em 50 mL de meio de cultivo durante 12 dias de crescimento.

5.4- Determinação do pH final

As variações verificadas no pH durante o crescimento microbiano foram distintas. De modo geral foi observado aumento do pH em, aproximadamente uma unidade, por *Pleurotus sajor caju* (020) em relação ao controle, quando crescido no meio 1, independentemente do corante utilizado. Já no meio 3 foi observado leve diminuição do pH em relação ao controle. Quanto ao *Phanerochaete chrysosporium* não foram observadas variações do pH entre o meio de crescimento 1 e o respectivo controle, para todos os corantes. Em relação ao efluente verificou-se leve aumento do pH do meio em relação ao respectivo controle. Esses dados indicam que os corantes presentes nos meios não influenciaram o pH dos meios de crescimento (**Figuras 7 e 8**).

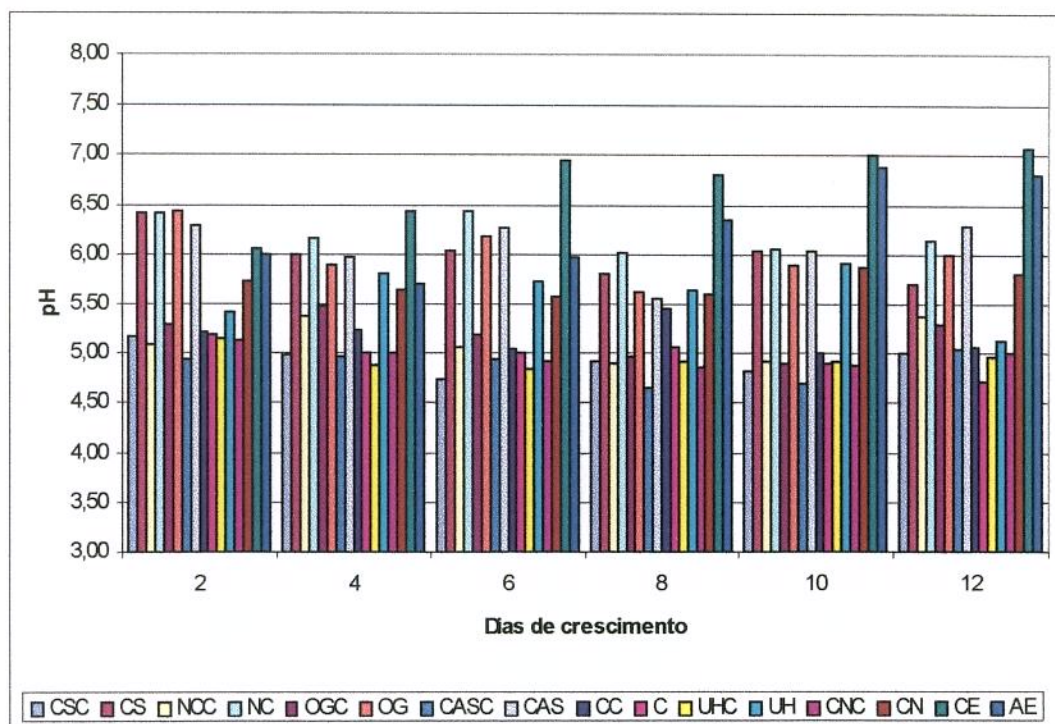


Figura 7: Efeito do crescimento do *Pleurotus sajor caju* (020) no pH dos meios de cultivo.

Legenda:

Meio 1

CSC - Combinação de corante sintéticos controle

CS - Combinação de corante sintéticos amostra

NCC - *New coccine* controle

NC - *New coccine* amostra

OGC - *Orange G* controle

OG - *Orange G* amostra

CASC - *Chrome azurol S* controle

CAS - *Chrome azurol S* amostra

CC - Carmim controle

C - Carmim amostra

UHC - Urucum hidrossolúvel controle

UH - Urucum hidrossolúvel amostra

CNC - Combinação de corantes naturais controle

CN - Combinação de corantes naturais amostra

Meio 3

CE - Efluente controle

AE - Efluente amostra

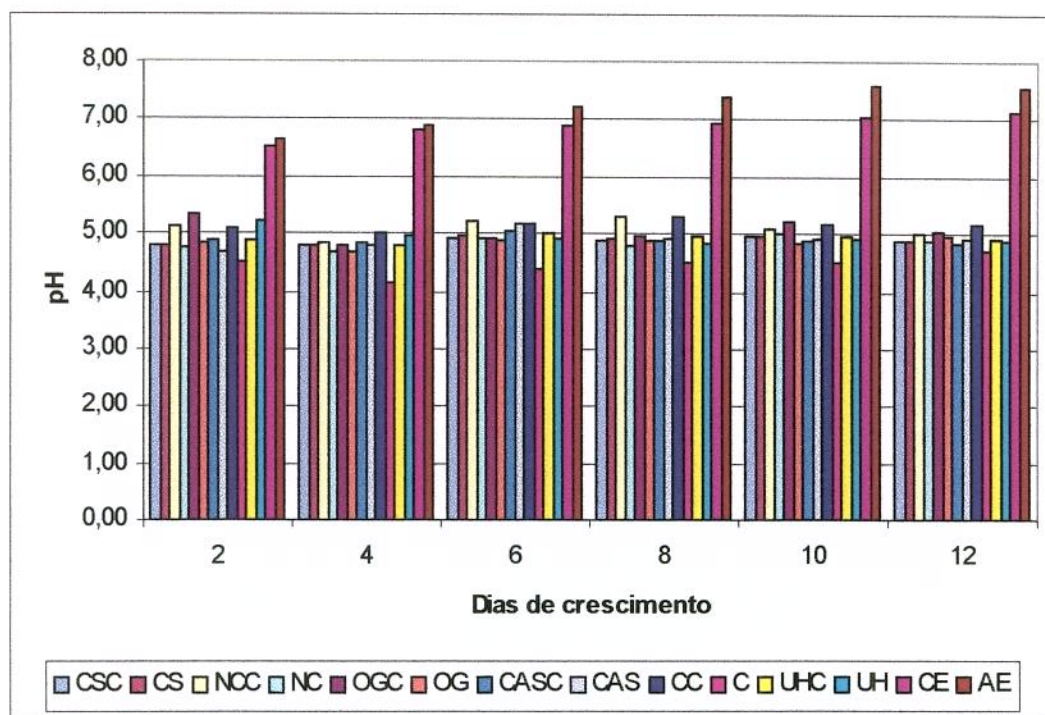


Figura 8: Efeito do crescimento do *Phanerochaete chrysosporium* no pH dos meios de cultivo.

Legenda:

Meio 1

CSC - Combinação de corante sintéticos controle

CS - Combinação de corante sintéticos amostra

NCC - *New coccine* controle

NC - *New coccine* amostra

OGC - *Orange G* controle

OG - *Orange G* amostra

CASC - *Chrome azurol S* controle

CAS - *Chrome azurol S* amostra

CC - Carmim controle

C - Carmim amostra

UHC - Urucum hidrossolúvel controle

UH - Urucum hidrossolúvel amostra

CNC - Combinação de corantes naturais controle

CN - Combinação de corantes naturais amostra

Meio 3

CE - Efluente controle

AE - Efluente amostra

5.5- Determinação da DQO

Os tratamentos físico-químicos, biológicos, e mesmo pré-tratamentos, reduzem a toxicidade de efluentes industriais e domésticos. BRITO (1996) investigando a toxicidade em refinarias de petróleo, revela que existe correlação positiva e altamente significativa entre DQO e toxicidade nas amostras de efluentes. A redução da DQO é acompanhada da redução de toxicidade.

Nos experimentos de determinação da DQO ora empreendidos, foram observados os mais baixos valores de DQO para os corantes azo (*orange G*, *new coccine*), e também para a combinação de corantes sintéticos no 10º dia de crescimento de *Pleurotus sajor caju* (020). A menor redução dos valores de DQO por *Phanerochaete chrysosporium* foi para os corantes naturais no 8º dia e para o corante sintético *chrome azurol S* no 10º dia de crescimento. A análise do efluente bruto mostrou o valor de DQO = 664 mg/O₂ /L. Para ambos os fungos as taxas de redução da DQO do efluente foram semelhantes, sendo que o valor mais baixo encontrado para *Pleurotus sajor caju* (020) foi de 194 mg/L (69%) e 167 mg/L (74%) para *Phanerochaete chrysosporium*, ambos no 12º dia de crescimento. De maneira interessante, constatou-se um aumento nos valores de DQO por ambos os fungos, na maioria dos meios, depois que eles alcançaram o mais baixo valor

de DQO, sugerindo que possa ter acontecido a formação de uma molécula mais complexa, possivelmente por um mecanismo de repolimerização. Esses dados podem ser analisados nas **Figuras 9 e 10**.

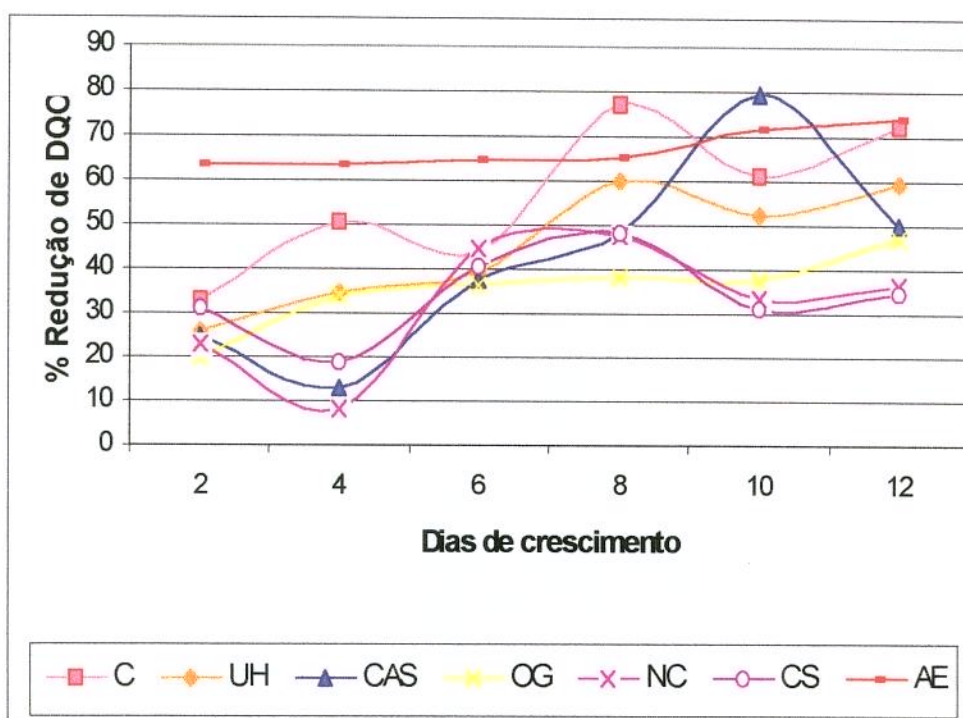


Figura 9: Porcentagem de Redução da Demanda Química de Oxigênio por *Phanerochaete chrysosporium* nos meios de crescimento.

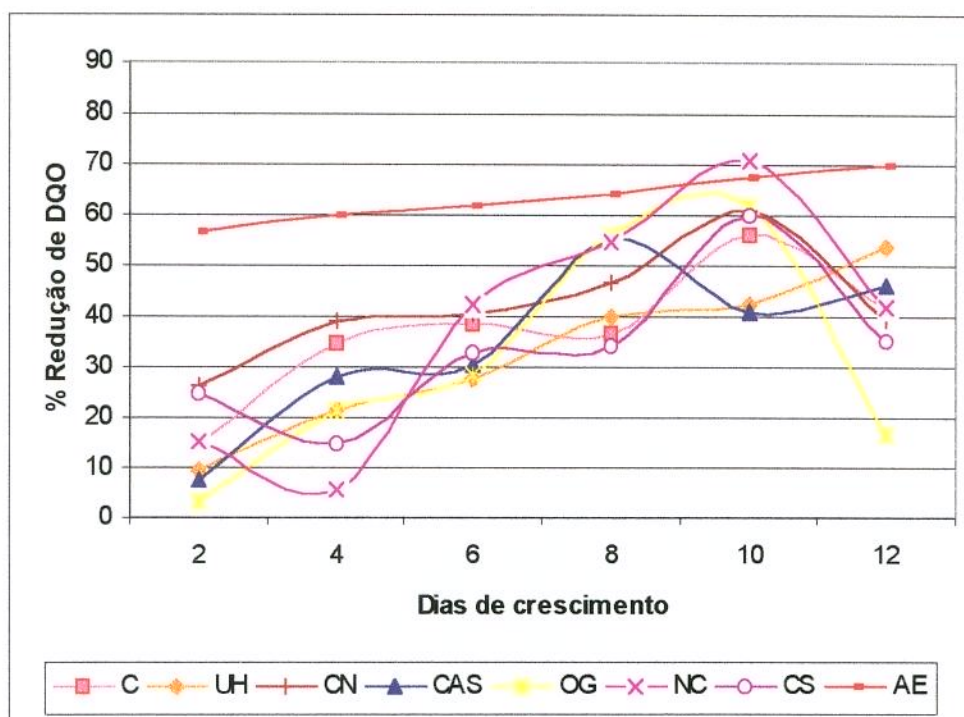


Figura 10: Porcentagem de Redução da Demanda Química de Oxigênio por *Pleurotus sajor caju* (020) nos meios de crescimento.

5.6 –Atidades enzimáticas

A habilidade do *Phanerochaete chrysosporium* e outros fungos de degradação branca em degradar, descolorizar ou mineralizar corantes é consequência da alta ação oxidativa e do sistema ligninolítico não específico destes microorganismos. As enzimas lignina peroxidase extracelular, manganês peroxidase, lacases e geradoras de peróxido de hidrogênio, como álcool veratrílico oxidase são componentes essenciais do sistema enzimático ligninolítico de vários fungos de degradação branca. Estes fungos têm grande

potencial para aplicações biotecnológicas em processos de remediações ambientais.

Nas *tabelas 1 e 2*, pode ser visto que ambos os fungos exibiram atividades ligninolíticas que variaram com o dia de crescimento e com o corante usado, mas em geral *Pleurotus sajor caju* (020) apresentou atividades mais altas de peroxidases e lacases em ambos os substratos (o-dianisidina e siringaldazina), em relação à *Phanerochaete chrysosporium* que, produziu diferenças não muito significativas. Um estudo conduzido por KEREM *et al.*, (1992) com *Phanerochaete chrysosporium* mostrou que a degradação da lignina por esse fungo está relacionada com a excreção de uma enzima chave, a LiP. No caso de uma linhagem de *Pleurotus ostreatus*, nenhuma atividade de LiP foi encontrada, tendo a lacase sido apontada como a responsável pela degradação da lignina. Concluiu-se também que a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato por oxidar grupos fenólicos, agindo como uma enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. Esta enzima tem ampla especificidade para com o substrato e oxida compostos fenólicos por abstração de um elétron, com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar à despolimerização.

A especificidade da enzima para o substrato depende da origem da lacase (GOLD & ALIC, 1993); sua função fisiológica ainda não é clara e seu

papel na biodegradação da lignina é incerto. Contudo, a lacase e a manganês peroxidase devem agir complementarmente ou sinérgicamente. A lacase é uma polifenoloxidase produzida por alguns fungos da podridão branca, entretanto, *Phanerochaete chrysosporium* produz pouca atividade desta enzima (TUOR *et al.*, 1995).

O sistema enzimático de degradação da lignina encontrado nos fungos basidiomicetos é o responsável pela degradação de corantes e outros xenobióticos. Vários trabalhos publicados nesta década têm esclarecido o papel e a importância das enzimas ligninolíticas nos processos de descoloração e degradação de corantes. Segundo KIRBY *et al.*, (1995) na descoloração de um efluente têxtil artificial por *Phanerochaete chrysosporium*, o papel da lignina peroxidase não ficou claro, pois somente pouca atividade da enzima foi detectada no processo de descoloração dos vários corantes sintéticos estudados separadamente e misturados.

Estudos compilados por BUMPUS (1995), mostraram que a degradação dos corantes azo ocorre devido a uma reação de oxidação mediada por ligninas peroxidases e/ou manganês peroxidases que são secretadas pelos fungos da degradação branca durante o metabolismo secundário.

A atividade de MnP e lacase de *Pleurotus* sp. crescido em meio líquido e em meio sólido foi estudado por LANG *et al.*, (1996). A lacase

desempenhou um papel importante no início da degradação; o papel chave da LiP de *Phanerochaete chrysosporium* na biodegradação é executado pela MnP de *Pleurotus* sp. onde atividade de LiPs não foram detectadas.

De acordo com BANAT *et al.*, (1996), o mecanismo de descoloração de corantes poliméricos por fungos da podridão branca até então parece envolver as enzimas lignina peroxidases (LiPs) as peroxidases dependentes de manganês (MnPs) e lacases. Outras enzimas de natureza oxidativa, tais como as álcool veratril oxidases podem ter um papel importante na degradação da lignina.

Num trabalho realizado por SHIN *et al.*, em 1998, sobre a descoloração de corantes artificiais por peroxidase do fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus*, observou-se que a enzima descoloriu corantes trifenilmetanos e azo efetivamente.

Recentemente, PODGORNIK *et al.*, (1999) comparou a lignina peroxidase (LiP) extracelular do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* na capacidade de descolorir diferentes corantes comerciais. Foram observados padrões bem parecidos nas curvas cinéticas de descoloração para corantes de substâncias químicas de diferentes classes e estruturas. Conclui-se que a descoloração é não-específica, não dependente do sistema cromóforo¹, é

ligeiramente dependente do grupo auxocromo², e não dependente do sinal e distribuição de elétrons.

¹Cromóforo: grupo responsável pela cor

²Auxocromo: grupo que intensifica a cor

Tabela 1: Atividades das enzimas manganês-peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), álcool veratrílico oxidase (AVO), lacase (LD usando o-dianisidina e LS usando siríngaldazina como substratos) e peroxidase (PD usando o-dianisidina e PS usando siríngaldazina como substratos), nos dias 4, 8 e 12 de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium* no meio 1 em diferentes corantes: *chrome azurol S* (CA); *new coccine* (NC); *orange G* (OG); combinação de corantes sintéticos (MS); carmim (C); urucum hidrossolúvel (UH).

Atividade Enzimática (U/L)																				
MnP			LiP			AVO			LD			LS			PD			PS		
4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12
CA	4,48	0,00	0,26	0,07	2,44	0,42	0,05	0,14	0,03	0,03	0,04	0,43	0,20	0,00	0,39	1,04	0,2	0,23	0,11	0,00
NC	0,00	0,00	0,53	0,07	0,05	0,00	0,05	0,00	0,07	0,15	0,00	0,07	0,37	0,21	0,32	0,23	0,68	0,10	0,45	0,32
OG	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,05	0,00	0,01	0,03	0,03	0,14	0,39	0,09	0,00	0,25	1,17	1,27	0,30	0,24	0,39
MS	6,31	1,16	26,6	0,01	5,42	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,17	0,35	0,07	0,17	0,24	1,49	0,49	0,35	0,58	0,20
C	0,00	0,00	0,00	1,12	0,16	0,05	0,00	0,00	0,04	0,02	0,02	0,19	0,15	0,10	1,08	0,10	0,16	0,17	0,36	0,19
UH	0,08	2,41	0,00	1,13	13,2	8,7	0,62	0,17	0,05	0,31	0,07	0,07	0,05	0,10	0,04	2,12	4,45	0,48	2,52	4,89

Tabela 2: Atividades das enzimas manganês-peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), álcool veratrílico oxidase (AVO), lacase (LD usando o-dianisidina e LS usando siríngaldazina como substratos) e peroxidase (PD usando o-dianisidina e PS usando siríngaldazina como substratos), nos dias 4, 8 e 12 de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020) no meio 1 em diferentes corantes: *chrome azurol S* (CA); *new coccine* (NC); *orange G* (OG); combinação de corantes sintéticos (MS); carmim (C); urucum hidrossolúvel (UH); combinação de corantes naturais (MN); e no efluente (EF).

Atividade enzimática (U/L)																						
MnP			LiP			AVO			LD			LS			PD			PS				
4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12		
CA	0,00	11,3	21,5	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	0,05	3,01	17,7	1,74	3,12	4,47	2,03	1,15	3,61	1,54	3,90	4,95	1,56	
NC	0,08	0,00	2,24	0,07	0,00	0,00	0,05	0,07	0,16	1,56	20,4	2,40	2,07	2,09	2,73	3,49	3,52	2,44	1,81	2,36	2,10	
OG	0,00	0,00	0,80	0,42	0,00	0,00	0,13	0,23	0,21	1,71	14,0	1,63	3,63	4,58	3,52	1,74	3,02	1,18	4,27	4,57	3,21	
MS	0,00	0,08	1,97	0,00	0,01	0,00	0,00	0,08	0,07	3,19	16,6	1,64	2,94	5,44	0,92	2,39	3,85	1,56	4,54	5,14	0,84	
C	0,00	0,00	0,00	0,00	7,46	0,00	0,37	0,48	0,42	0,37	14,2	2,26	0,95	3,97	2,71	0,32	2,46	2,58	0,52	4,35	3,54	
UH	0,00	0,00	0,00	4,95	0,00	0,08	0,86	0,08	1,62	2,51	9,77	2,89	4,60	2,09	3,31	3,39	4,34	3,13	5,08	4,82	3,36	
MN	0,00	0,13	0,00	0,00	0,98	0,00	1,41	0,93	1,16	2,54	14,0	2,79	3,60	2,06	2,51	3,43	4,29	2,73	5,07	2,61	2,30	
EF	0,98	0,13	1,88	0,58	0,08	0,00	0,07	0,00	0,00	0,26	0,26	0,59	0,24	0,14	0,14	0,33	0,29	0,52	0,27	0,34	0,29	

5.7 -Verificação da descoloração dos corantes

A descoloração dos corantes *chrome azurol S* (**Figuras 11 e 12**), *new coccine* (**Figuras 13 e 14**), *orange G* (**Figuras 15 e 16**) e da mistura desses corantes (**Figuras 17 e 18**) ocorreu mais rapidamente para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, observando-se maiores taxas de descoloração desses corantes no 4º dia de crescimento deste fungo, as quais variaram de 75 a 100%, tomando por base apenas os picos de absorção correspondentes à faixa da luz visível (500nm). Em relação ao fungo *Pleurotus sajor caju* (020) a descoloração de *chrome azurol S* ocorreu somente no 10º dia e de *new coccine*, *orange G* e da mistura desses corantes no 8º dia de crescimento, atingindo de 60 a 75%, utilizando-se o mesmo critério. Para o corante carmim (**Figuras 19 e 20**), *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou maior descoloração no 4º (90%) dia de crescimento e *Pleurotus sajor caju* (020) alcançando tal percentual somente no 10º dia. A descoloração do urucum (**Figuras 21 e 22**), aconteceu de modo similar para ambos os fungos, com desempenho levemente superior (93%) para o *Pleurotus sajor caju* (020) contra 80% para *Phanerochaete chrysosporium*, observado no 4º dia. Houve excelente descoloração do meio contendo a combinação dos corantes naturais (**Figura 23**) e do efluente (**Figura 24**) no 2º dia de crescimento de *Pleurotus sajor caju* (020), alcançando taxas de 60 e 80% de descoloração,

respectivamente. Como, praticamente, não ocorreu nenhuma descoloração do efluente (**Figura 25**) por *Phanerochaete chrysosporium*, pode-se concluir que o *P saior caju* 020 apresenta maior potencialidade para emprego industrial na descoloração de efluentes. Tanto no meio 1 quanto no efluente todos os corantes sofreram adsorção em alguma extensão por ambos os fungos (anexo 3).

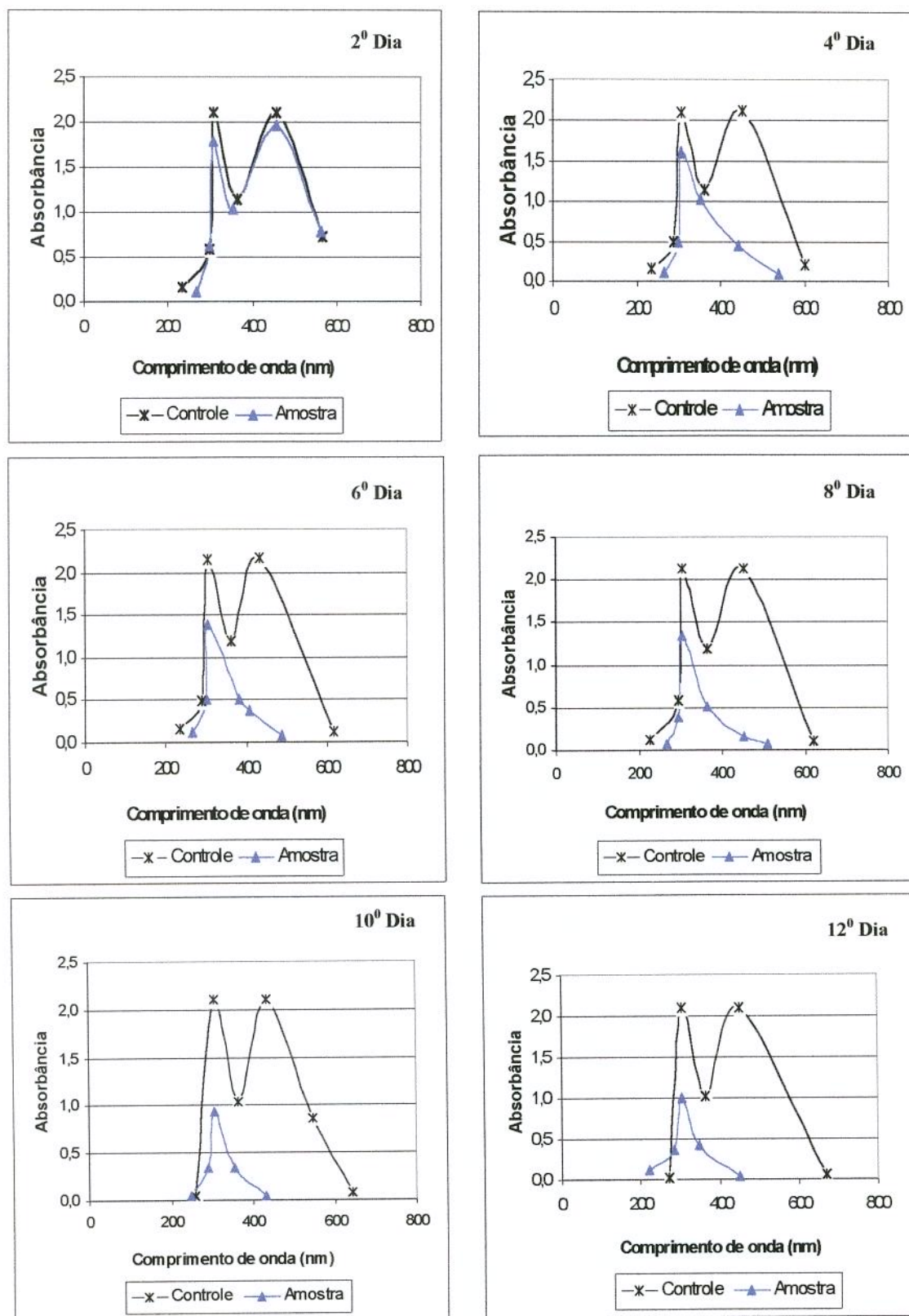


Figura 11: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Chrome Azurol S* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -2 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -1 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -1 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -1 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -1 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$



Graph of $f(x) = \begin{cases} 2x & -1 \leq x < 0 \\ 2 - x & 0 \leq x < 1 \\ -x & 1 \leq x \leq 2 \end{cases}$

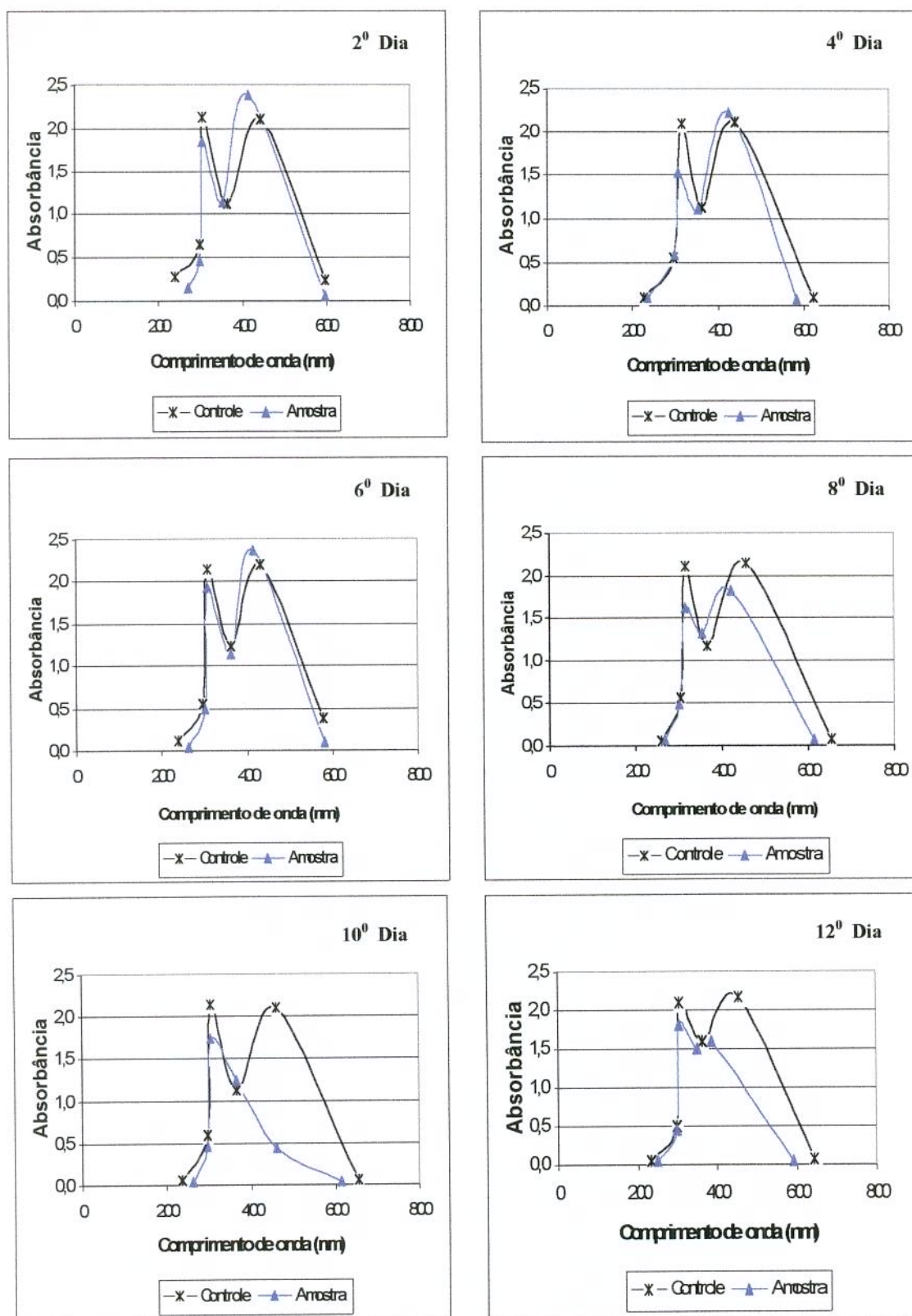


Figura 12: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Chrome Azurol S* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

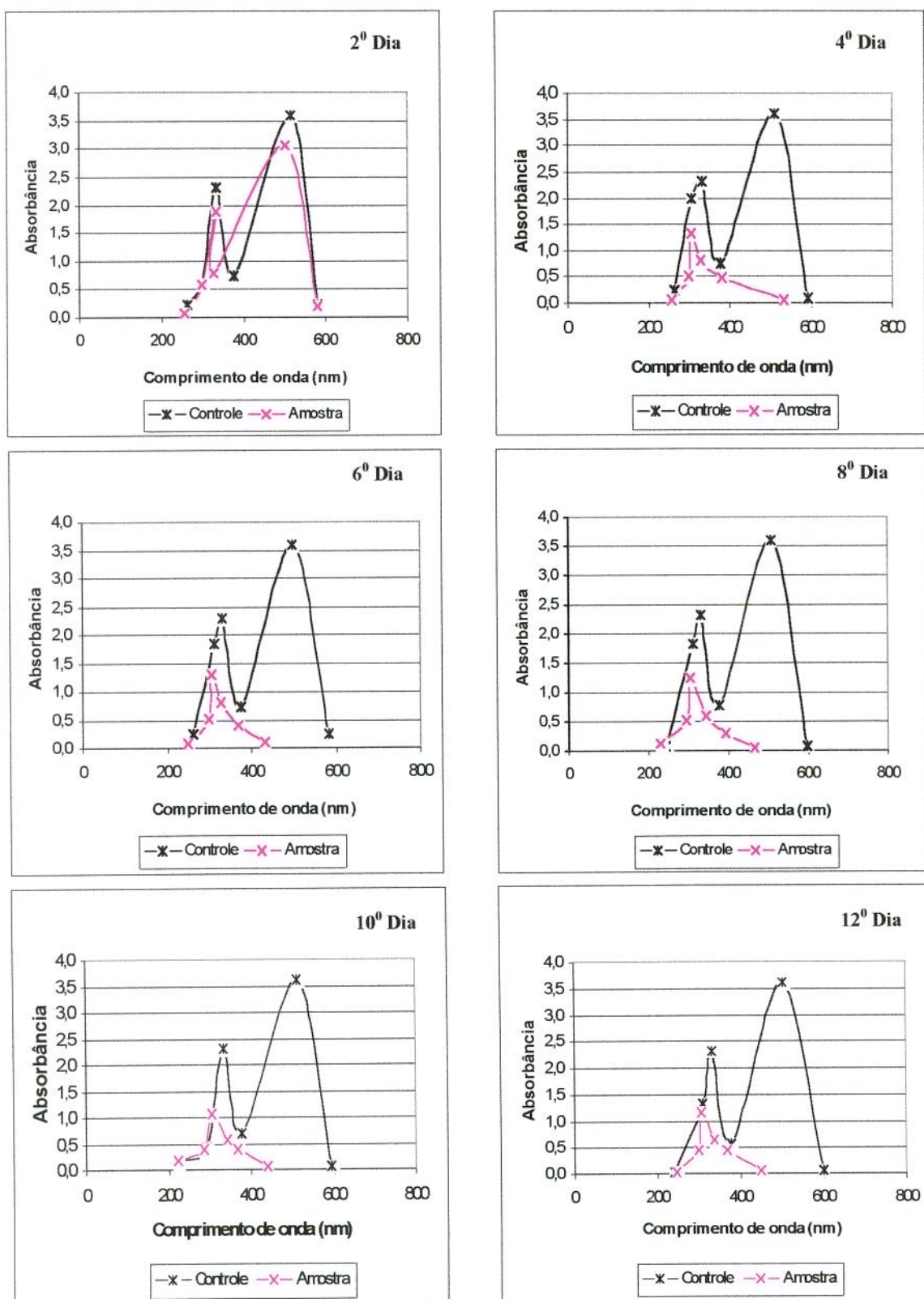


Figura 13: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *New coccine* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

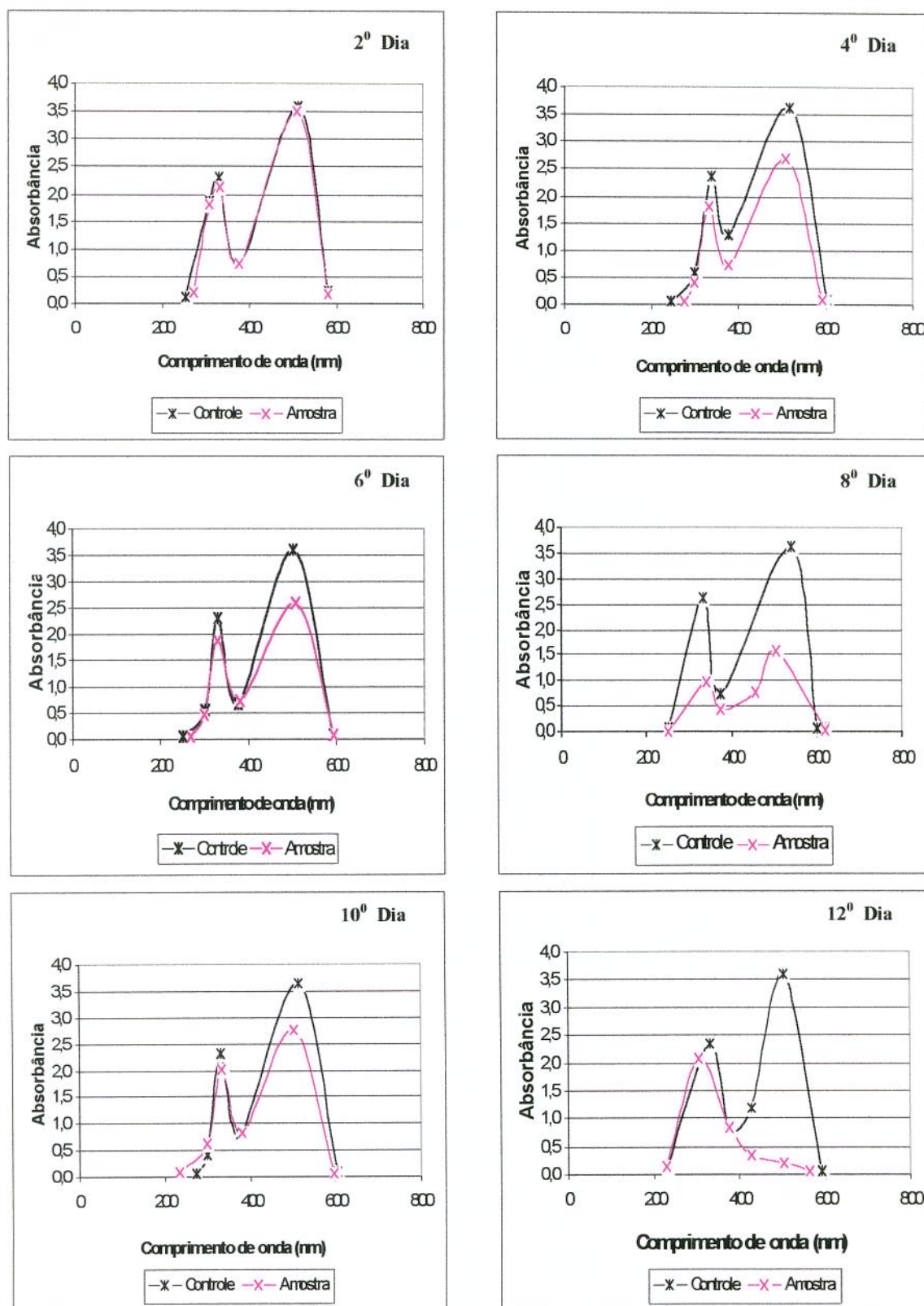


Figura 14: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *New coccine* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

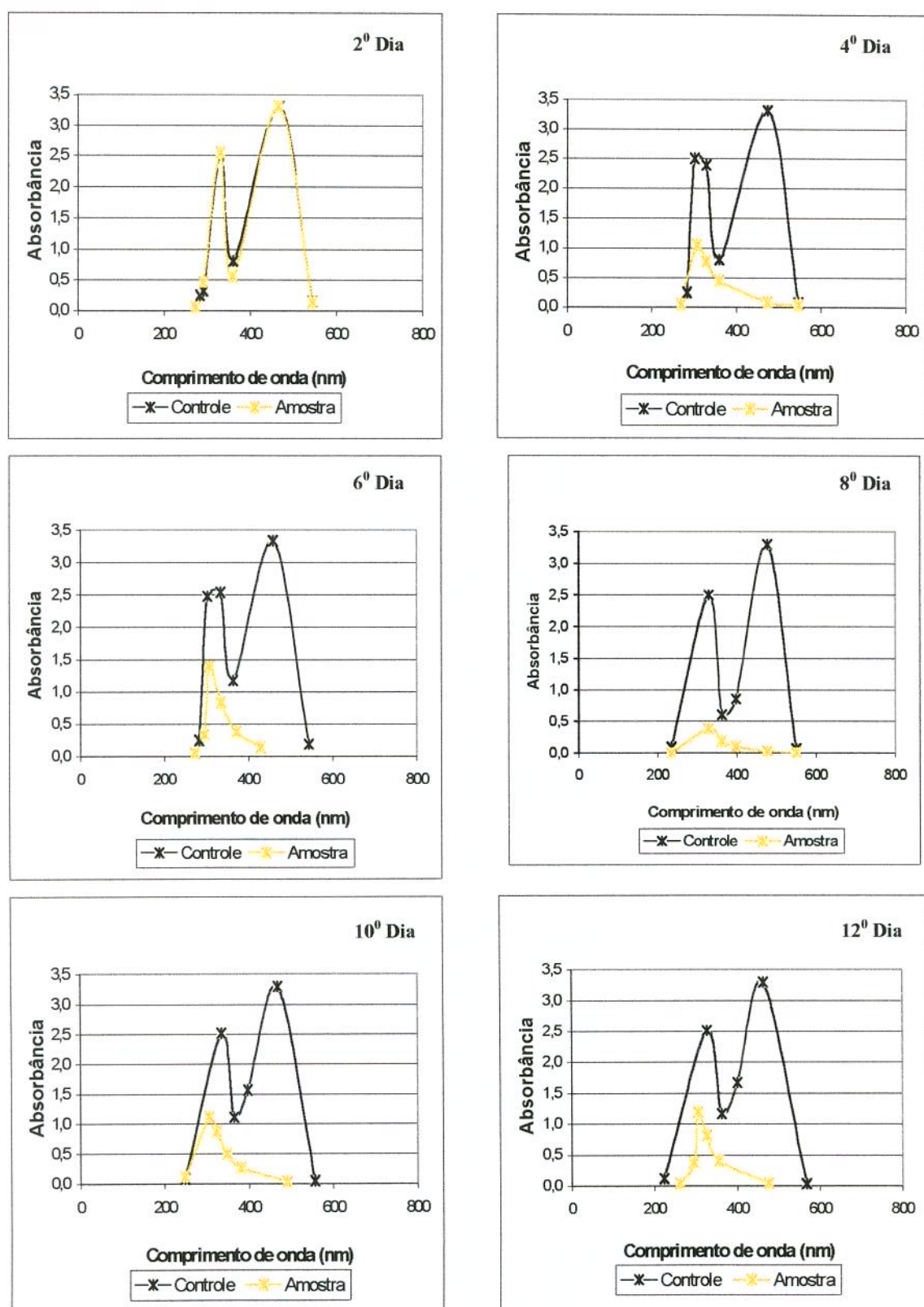


Figura 15: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Orange G* durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

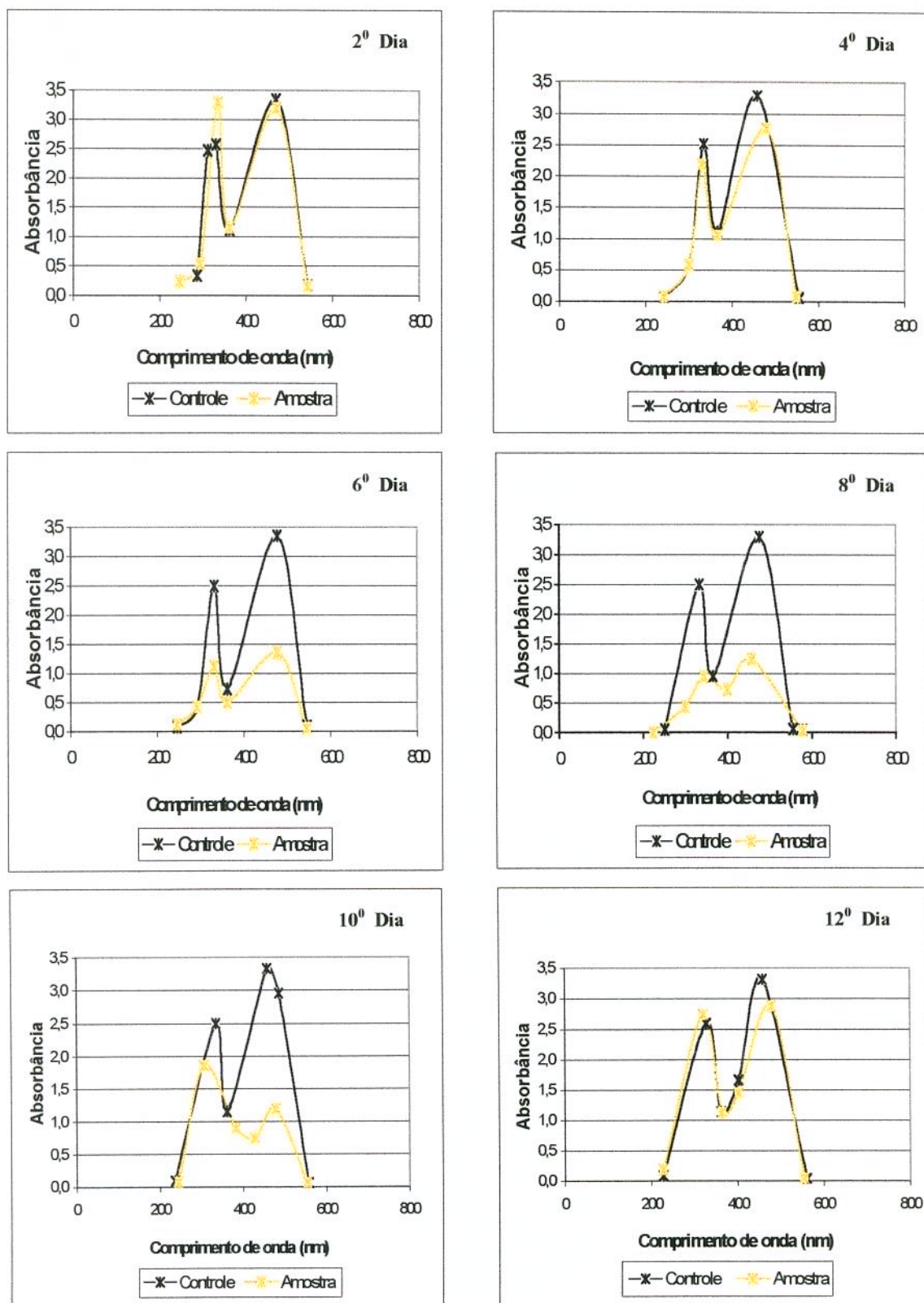


Figura 16: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante *Orange G* durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

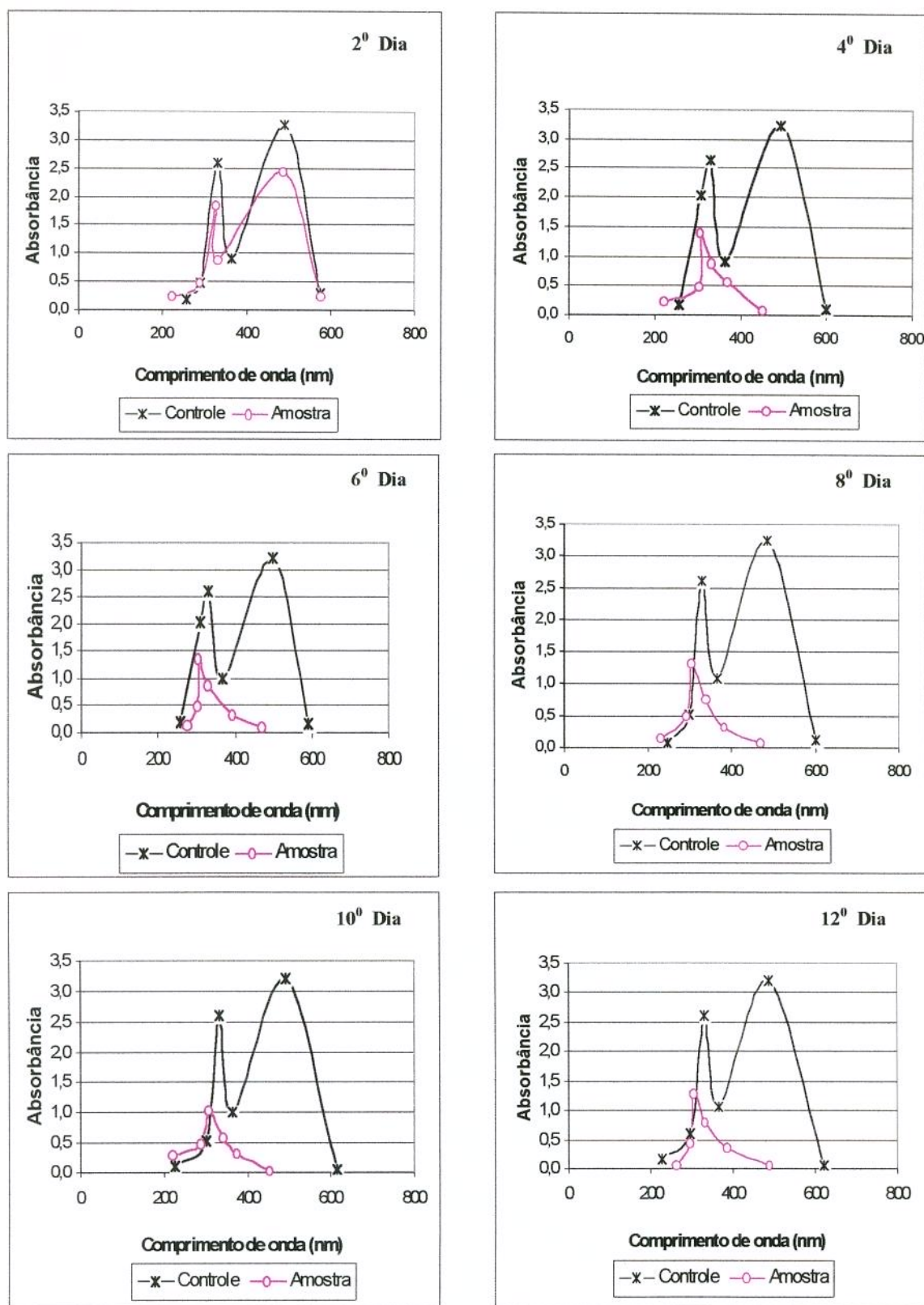


Figura 17: Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes sintéticos durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

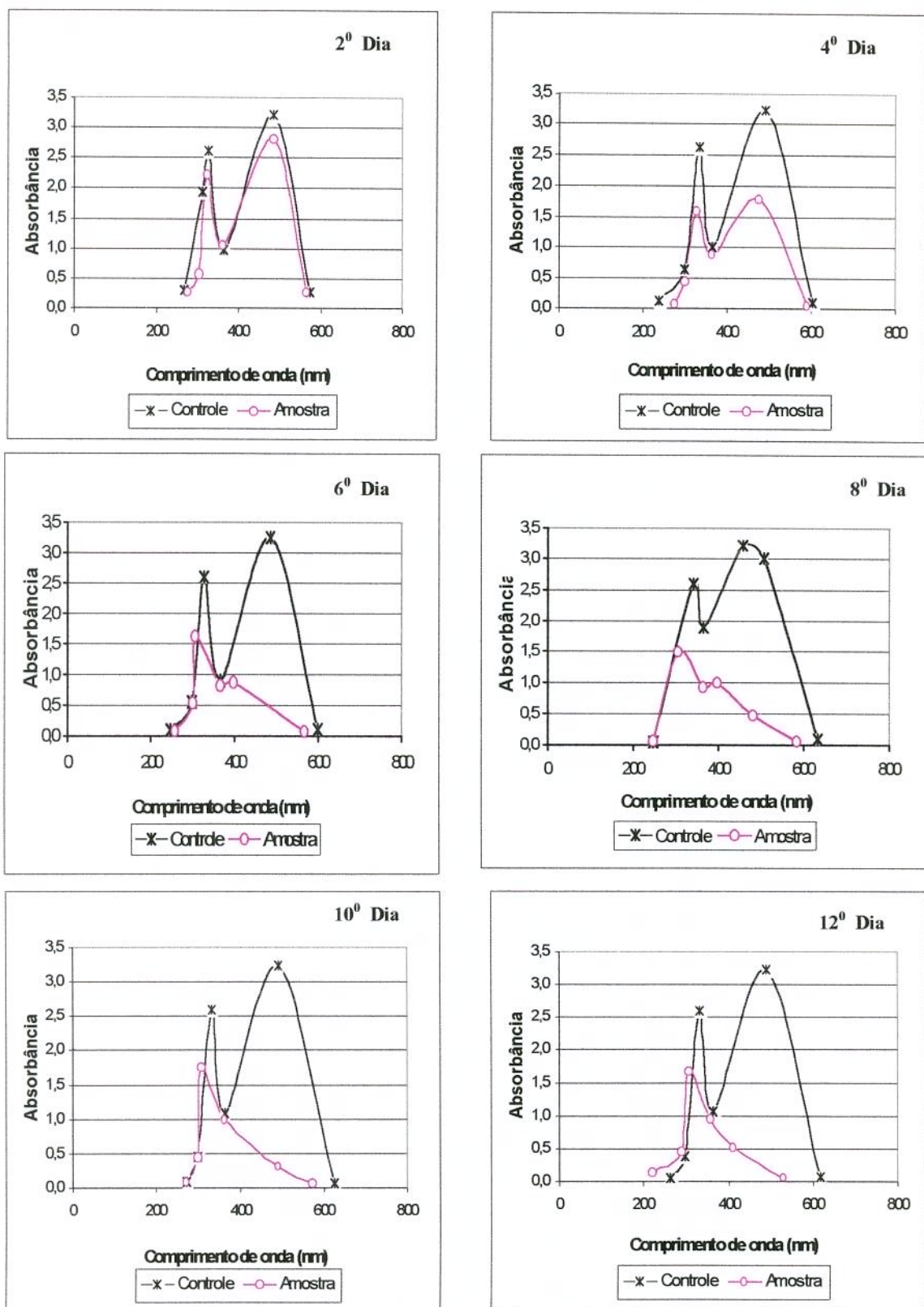


Figura 18: Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes sintéticos durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

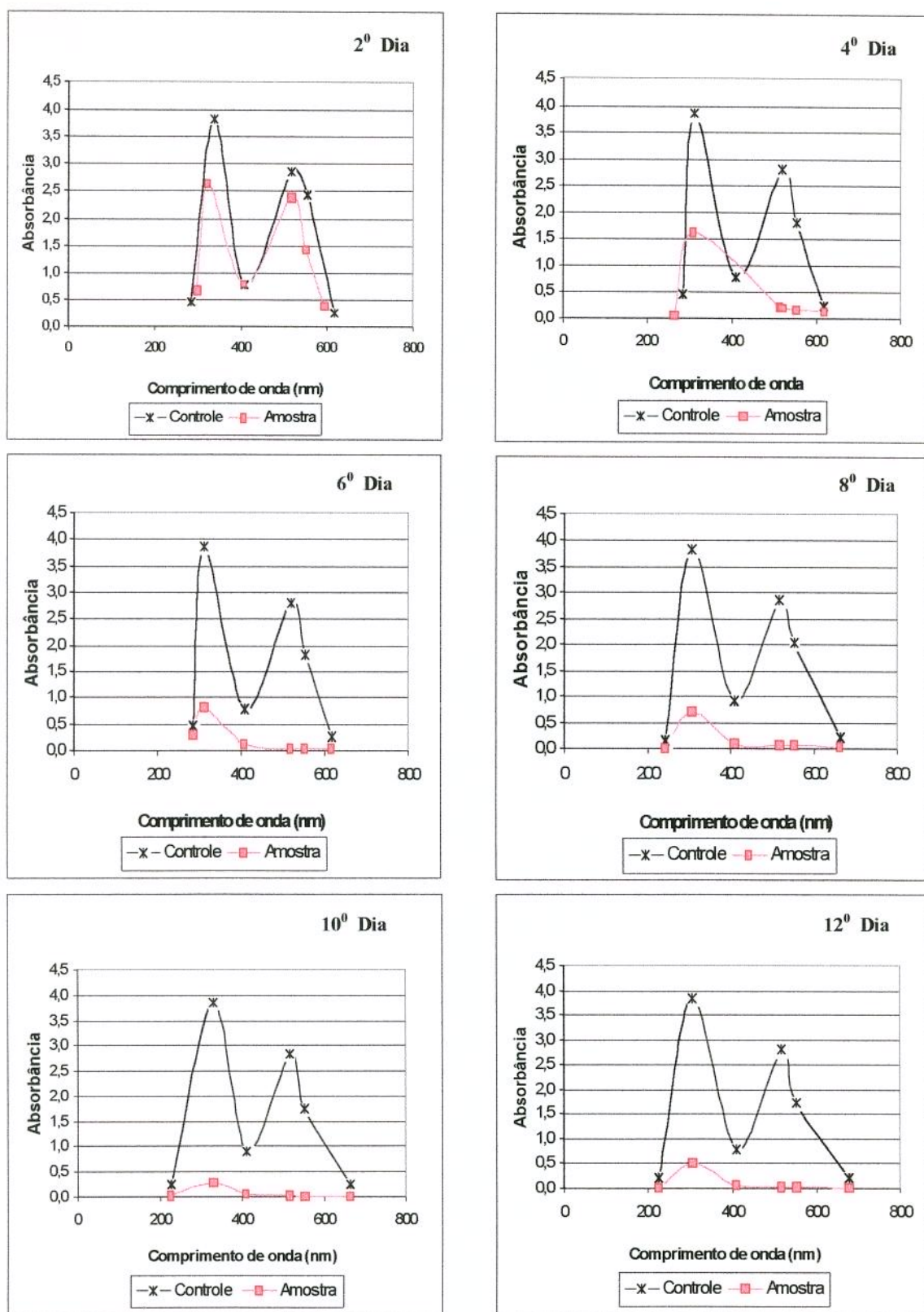


Figura 19: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Carmim durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

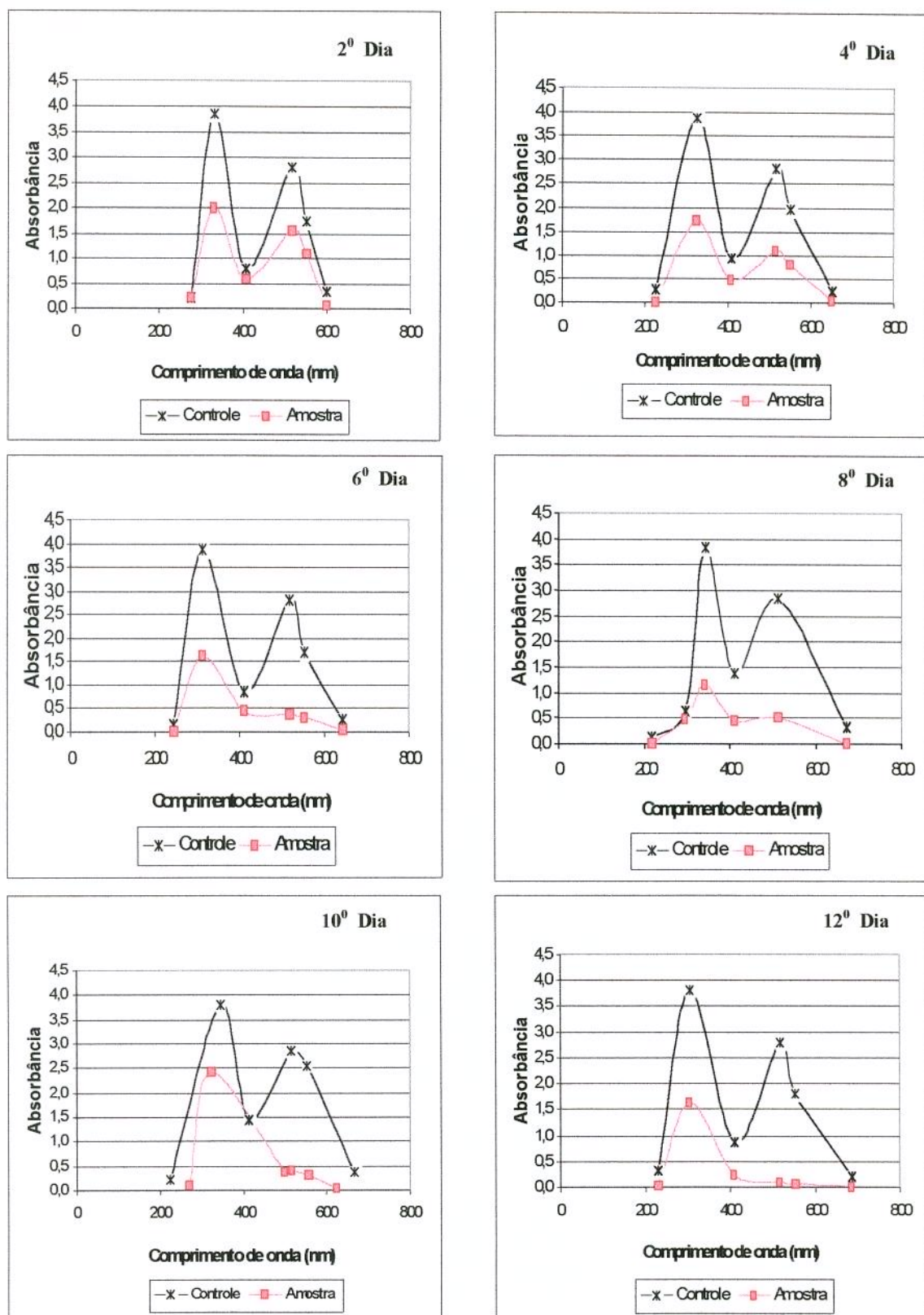


Figura 20: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Carmim durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

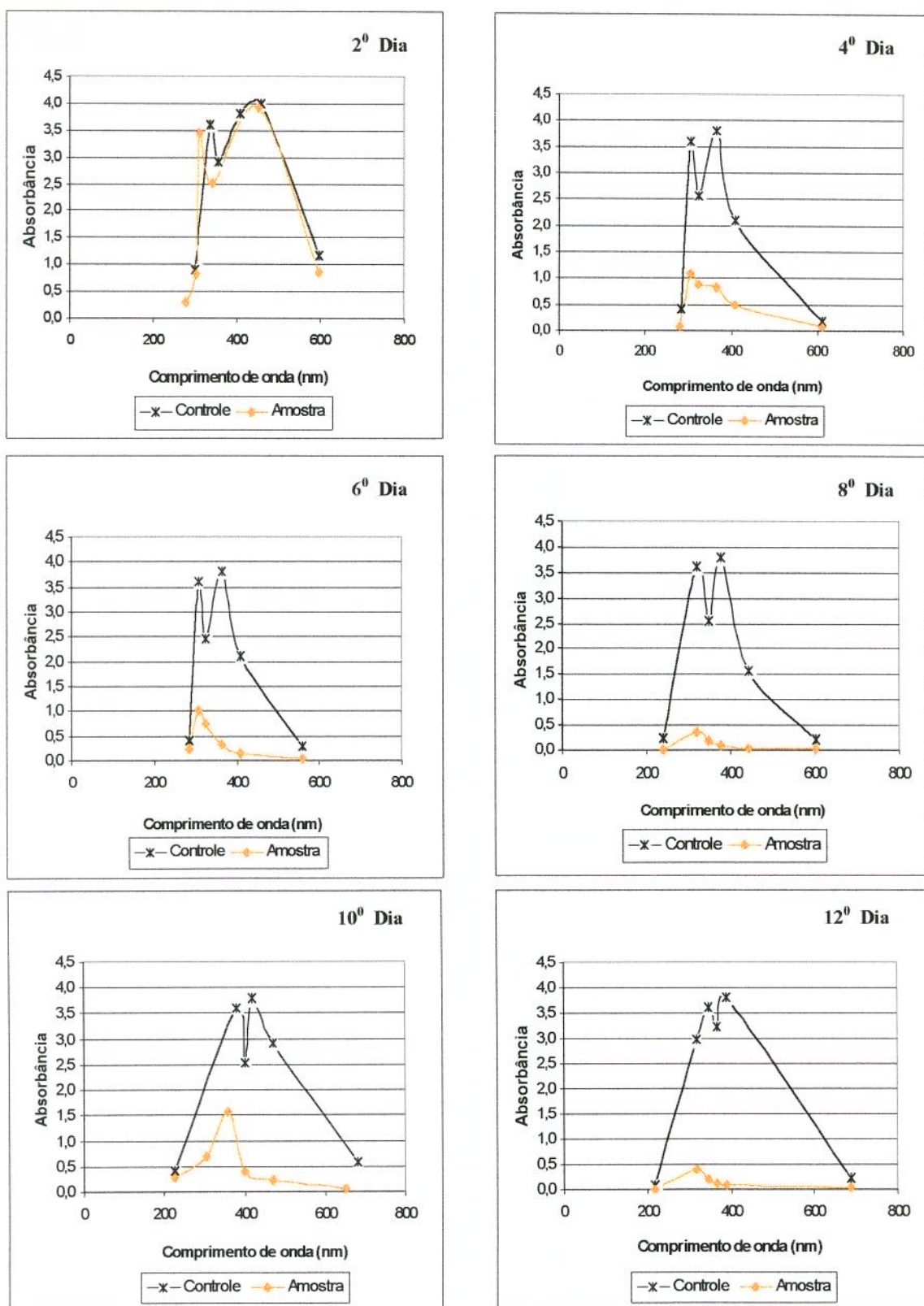


Figura 21: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Urucum hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

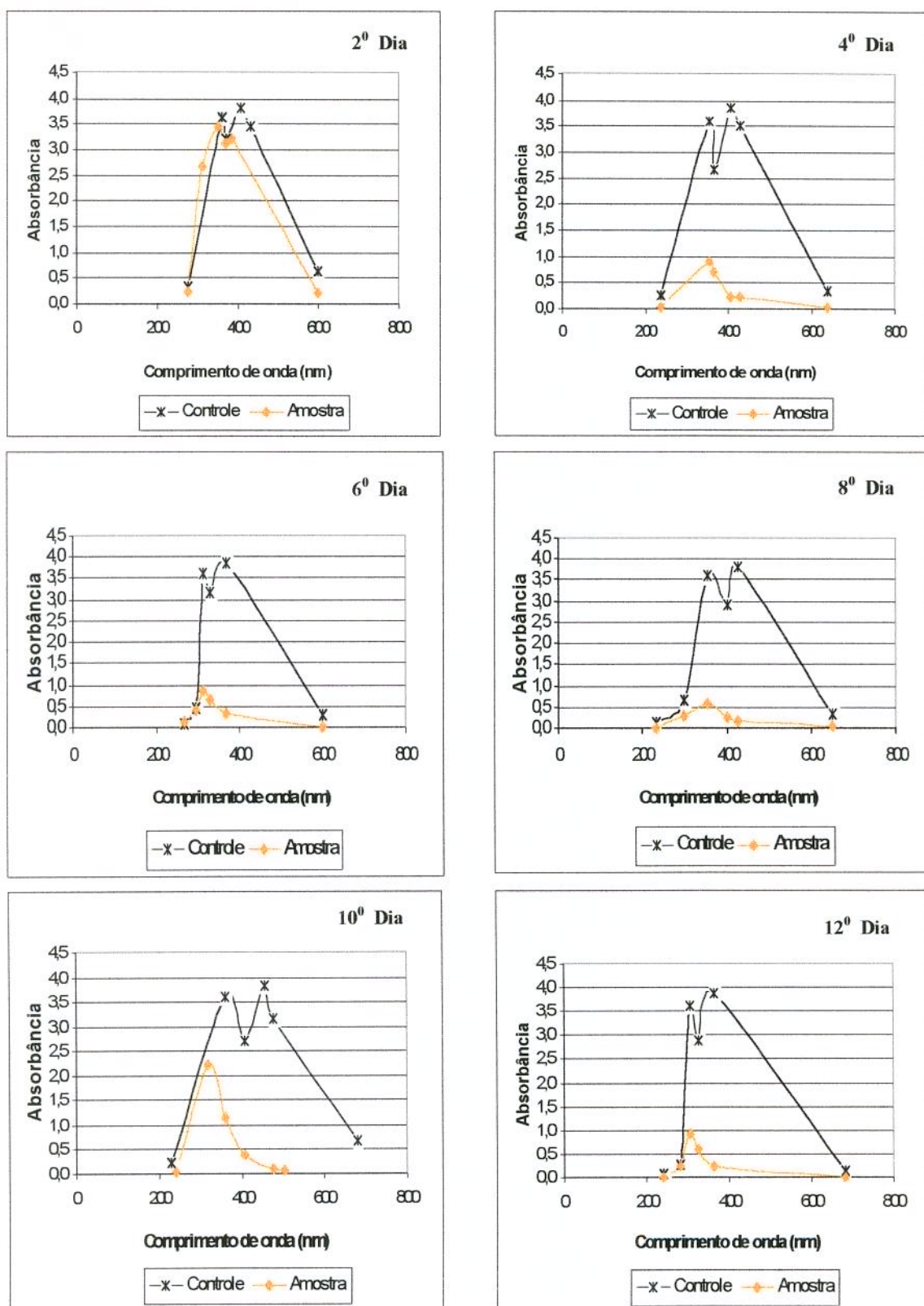


Figura 22: Espectro de absorção do meio 1 contendo o corante Urucum hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

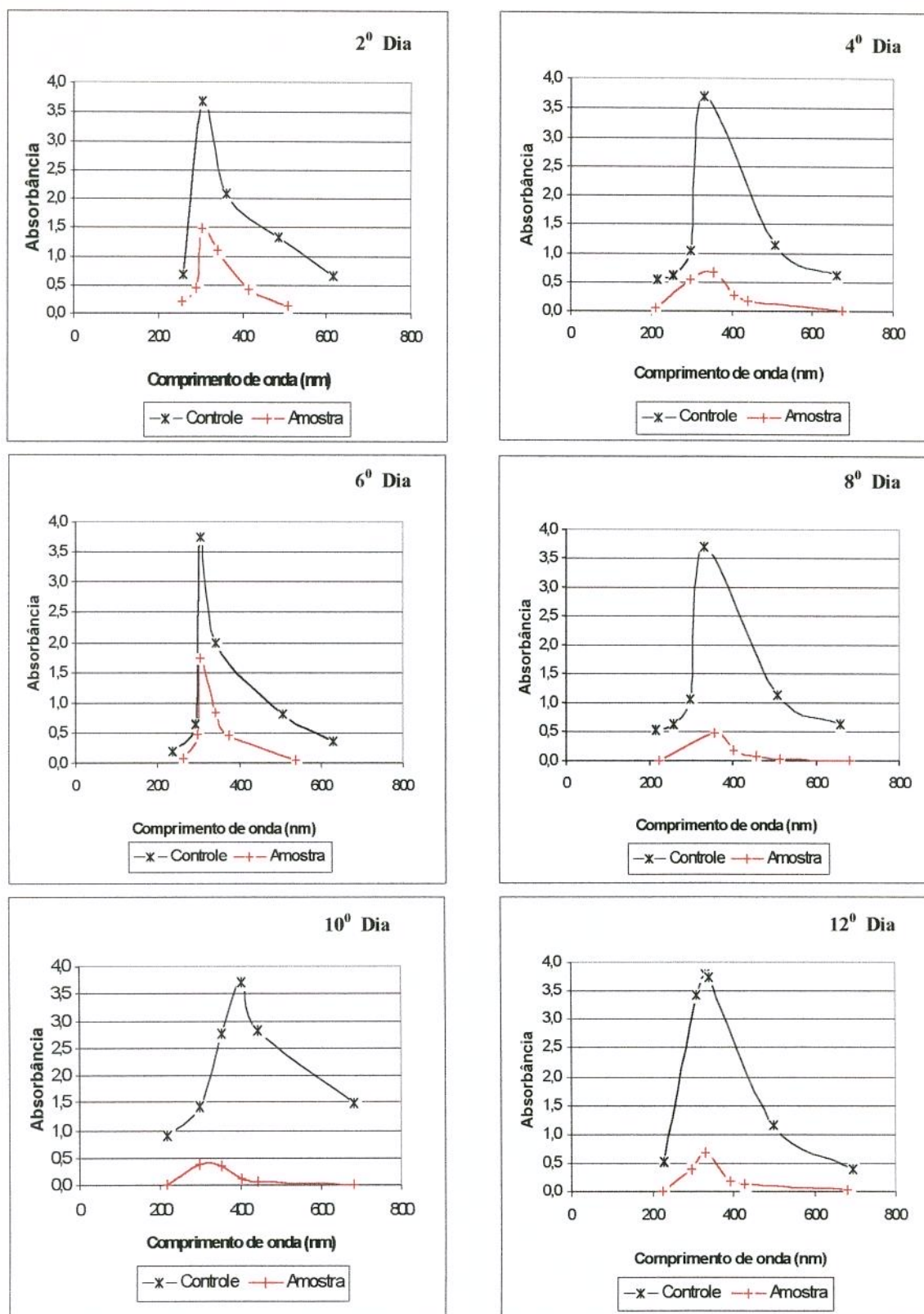


Figura 23: Espectro de absorção do meio 1 contendo a combinação dos corantes naturais durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

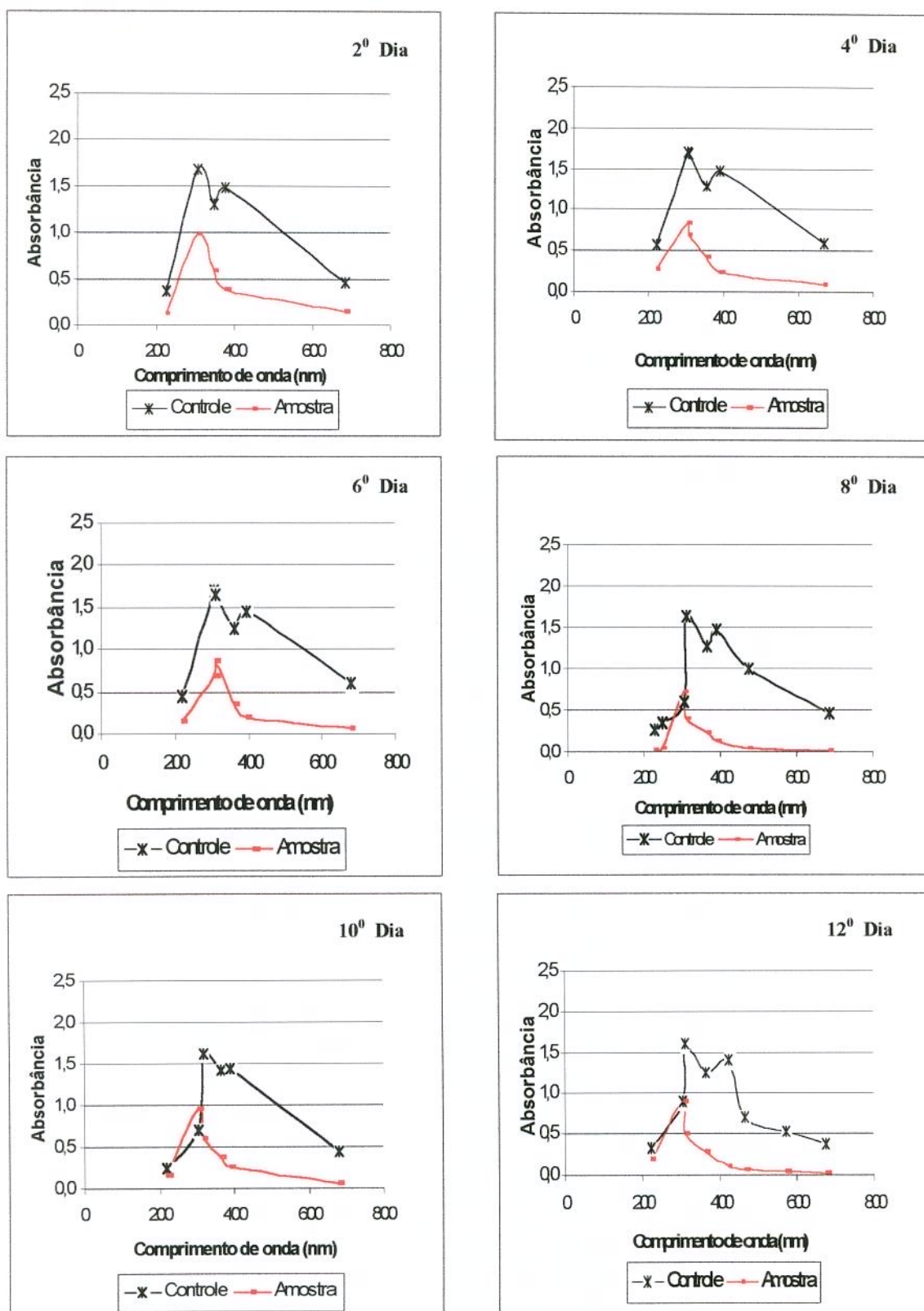


Figura 24: Espectro de absorção do efluente durante 12 dias de crescimento do fungo *Pleurotus sajor caju* (020).

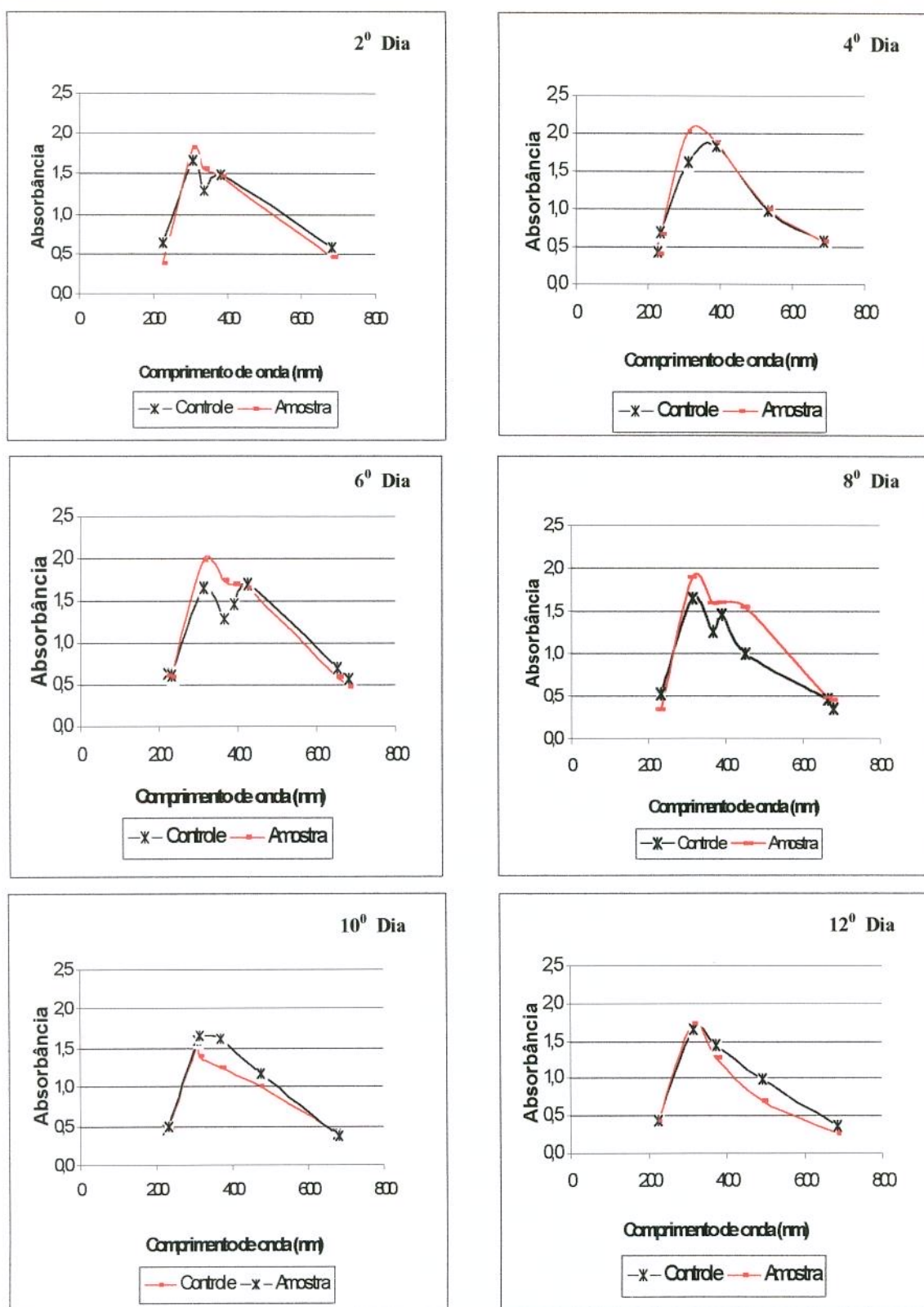


Figura 25: Espectro de absorção do efluente durante 12 dias de crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

A taxa de descoloração nos comprimentos de onda selecionados para a avaliação espectrofotométrica do sobrenadante das culturas (200nm/800nm), permitiu a percepção de significativas mudanças espectrais. Esses dados revelam que a descoloração foi devida à adsorção e à degradação dos corantes. Estas observações são concordantes com as realizadas em trabalhos clássicos de descoloração como o de GLENN & GOLD (1983) e KNAPP *et al.*, (1995).

GLENN & GOLD (1983) estudando a descoloração de vários corantes poliméricos por *Phanerochaete chrysosporium*, constataram que em meio líquido a descoloração é um processo do metabolismo secundário e que o sistema de degradação de lignina ou parte dele, é responsável pela descoloração. Como a adsorção ao micélio do fungo e as transformações por ele causadas, reduzem a quantidade do corante em solução, foram realizadas medidas de absorbância em dois comprimentos de onda. O decréscimo proporcional dos valores de absorbância indica a adsorção. Quando há grandes mudanças na razão de absorbância nos dois comprimentos de onda escolhidos, os corantes estão sendo degradados. A adição de inibidores da degradação de lignina, também inibiu a descoloração. Afirmaram ainda que a natureza polimérica dos corantes assegura que ao menos as etapas iniciais da descoloração são extracelulares.

De acordo com o trabalho de KNAPP *et al.*, (1995), quando a adsorção ocorre, o exame do espectro de absorção da luz revela que todos os picos diminuem proporcionalmente em igualdade entre si. Entretanto, quando a degradação ocorre, há a completa remoção do pico principal ou mudança significativa no espectro (isto é, uma mudança na absorbância relativa a dois picos ou desenvolvimento de um novo pico). A adsorção do corante também foi evidente a partir da inspeção da massa micelial; aquelas que adsorveram os corantes foram densamente coloridas, enquanto que aquelas que causaram degradação permaneceram brancas.

BORGERDING & HITES (1994) identificaram o comportamento nas fases aquosa e fase sólida de uma estação de tratamento municipal e a biodegradação de corantes cosméticos e alimentícios. Alguns corantes são rapidamente removidos por adsorção ao lodo, outros resistem à adsorção. Essa distribuição é dependente de interações entre o corante e o lodo ou simplesmente de processos de equilíbrio hidrofóbico. Os corantes hidrofóbicos e com grupos carboxilados são completamente adsorvidos; sendo que as moléculas de caráter hidrofílico ficam na fase aquosa.

Certos esquemas de tratamento podem ser aplicados em algumas indústrias que empregam um ou dois tipos de corantes, mas não para todas ou para aquelas que apresentam em seus efluentes uma mistura de corantes

(BANAT *et al.*, 1996). Nesse trabalho observou-se uma considerável descoloração dos meios contendo a combinação de corantes sintéticos e a combinação de corantes naturais, podendo as condições e métodos ora descritos oferecerem considerável contribuição na área.

Nessas análises de espectrofotometria de varredura, ocorreu um aumento nos valores da absorbância na maioria dos meios por *Pleurotus sajor caju* (020) e *Phanerochaete chrysosporium*, depois que estes alcançaram o mais baixo valor de descoloração, o que nos leva a sugerir que possa ter ocorrido a formação de uma molécula mais complexa, talvez por um mecanismo de repolimerização.

5.8- Determinação da degradação dos corantes

Para a determinação da degradação dos meios de cultivo contendo os corantes utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por ser uma técnica ideal para determinações de não voláteis, termicamente estáveis e compostos de alto peso molecular (anexos 2). Não foi possível a realização de CLAE no efluente e na combinação de corantes naturais devido à presença do corante urucum oleossolúvel, o qual poderia danificar a coluna cromatográfica e na combinação de corantes sintéticos devido aos diferentes solventes utilizados para os mesmos.

Os dados encontrados após a utilização da CLAE são praticamente coerentes com os encontrados para as análises de espectrofotometria de varredura. A degradação dos corantes *chrome azurol S* (**Figura 25**), *new coccine* (**Figura 26**), *orange G* (**Figura 27**) ocorreu mais rapidamente para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, observando-se maiores taxas de degradação desses corantes no 4º dia de crescimento deste fungo. Em relação ao fungo *Pleurotus sajor caju* (020) a degradação de *chrome azurol S* ocorreu somente no 10º dia e de *orange G* e *new coccine* no 8º e 12º dia de crescimento, respectivamente. Para o corante carmim (**Figura 28**), *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou maior degradação no 6º dia de crescimento e *Pleurotus sajor caju* (020) somente no 12º dia. A degradação do urucum (**Figura 29**) aconteceu de modo similar para ambos os fungos, alcançando praticamente as mesmas taxas de degradação no 8º dia de crescimento.

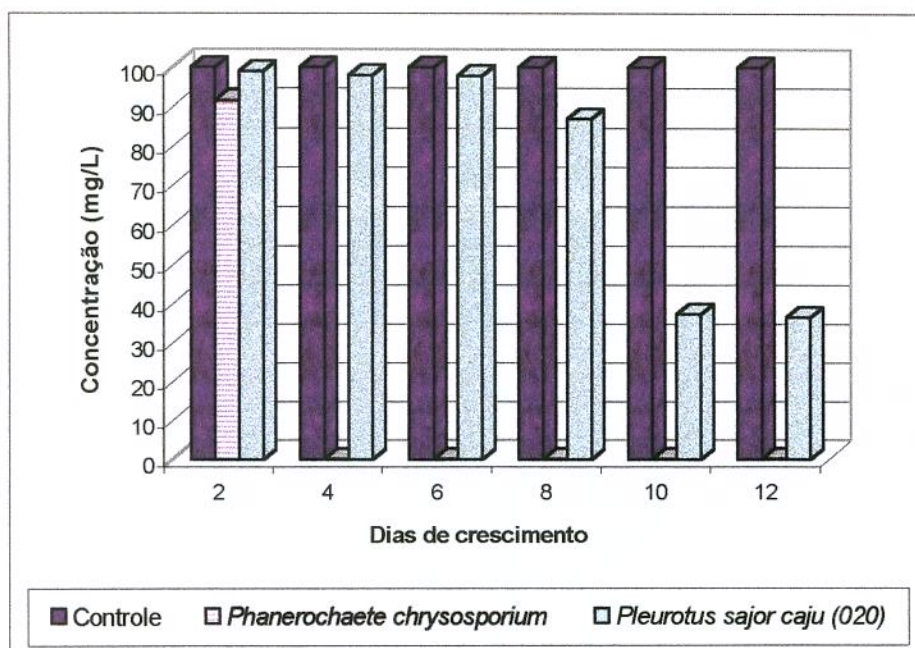


Figura 26: Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *chrome azurol S* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).

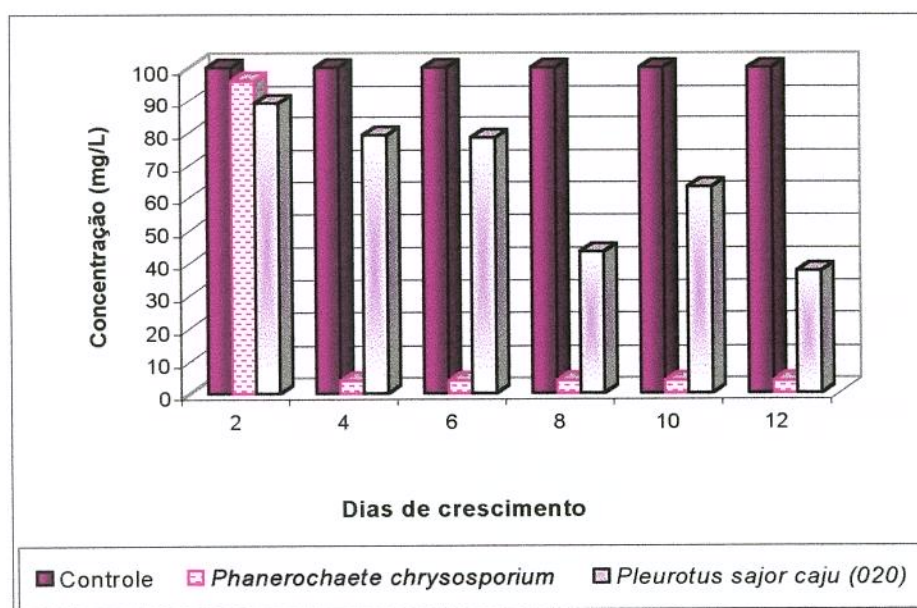


Figura 27: Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante *new coccine* durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).

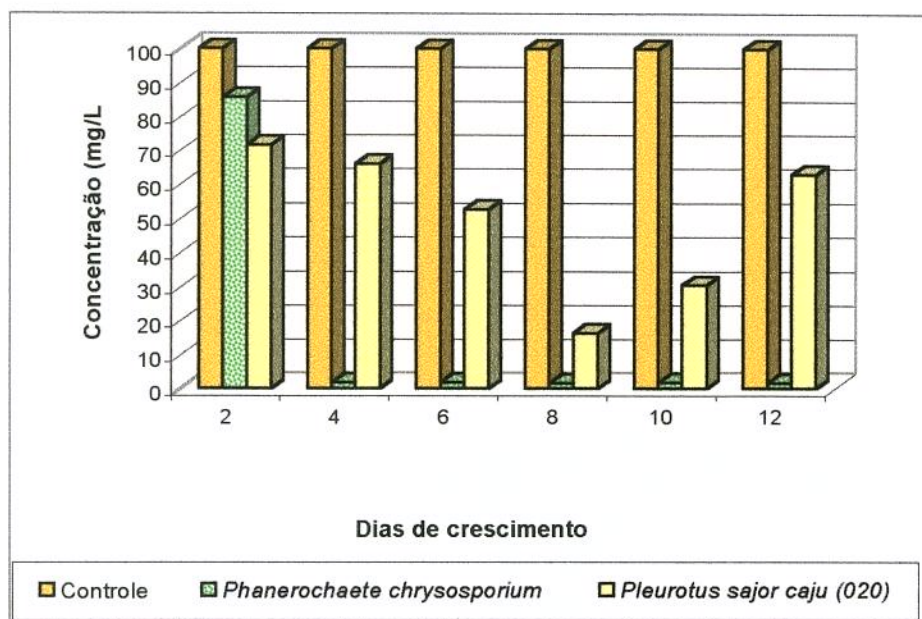


Figura 28: Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante orange G durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).

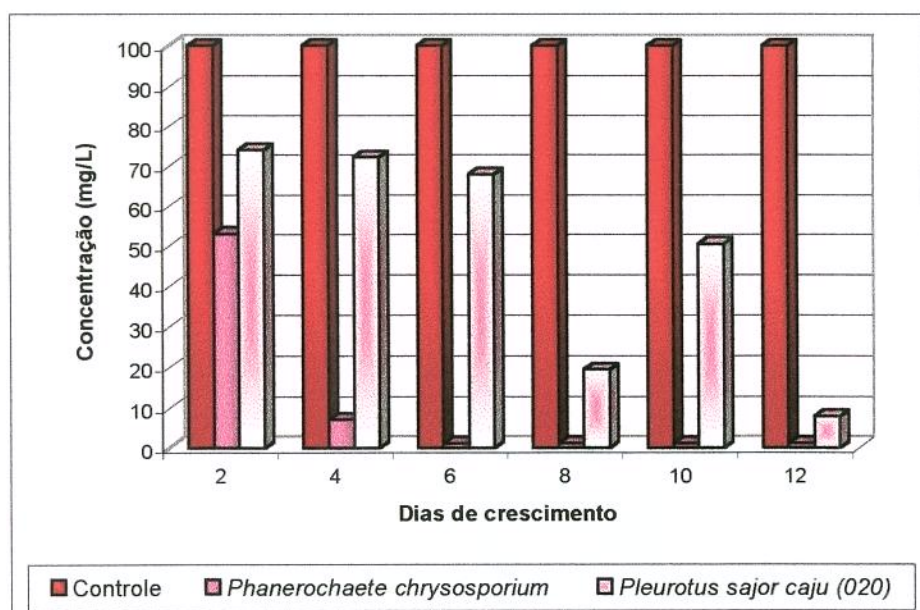


Figura 29: Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante carmim durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).

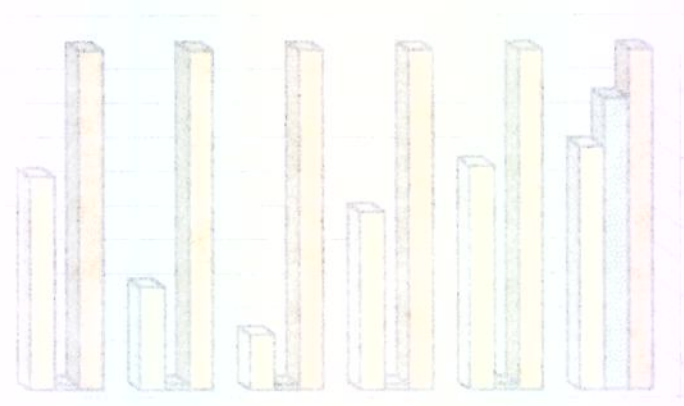


Figure 1. Percentage of *P. citri* and *P. citreus* in different tissues of *A. taeniorhynchos*. The data were obtained from 100 individuals of each species, and the results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

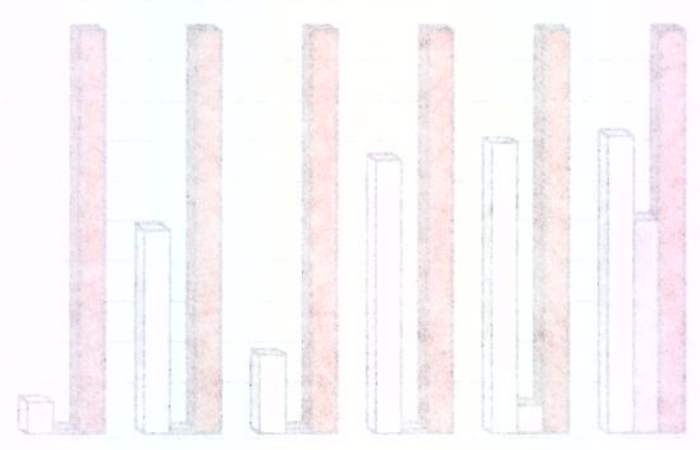


Figure 2. Percentage of *P. citri* and *P. citreus* in different tissues of *A. taeniorhynchos*. The data were obtained from 100 individuals of each species, and the results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

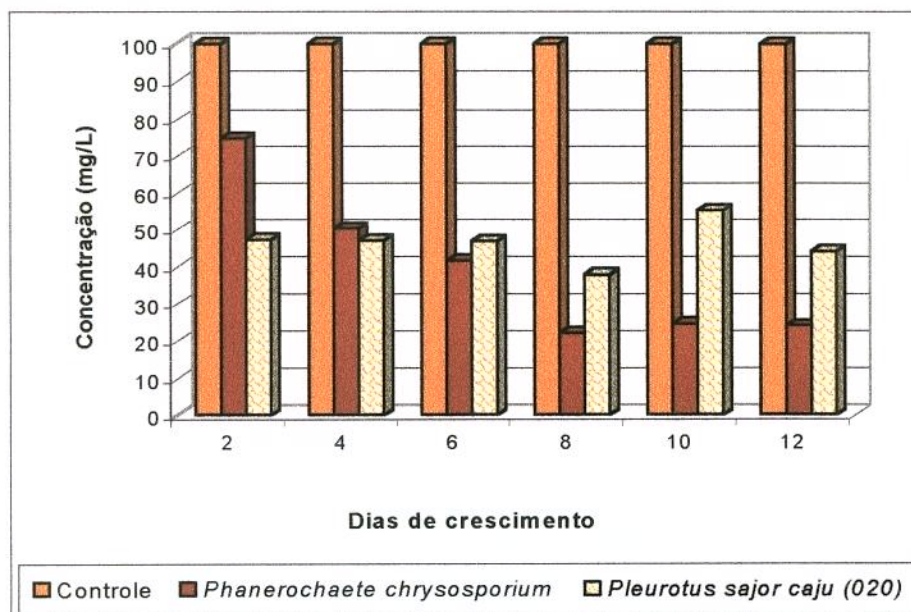


Figura 30: Gráfico do cromatograma do meio 1 contendo o corante urucum hidrossolúvel durante 12 dias de crescimento dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju* (020).

A variação na complexidade da estrutura dos diferentes corantes é um dos fatores que influencia a capacidade de degradação. A degradação e a adsorção ao micélio dos fungos são importantes processos para a remoção de corantes dos efluentes domésticos e industriais, sendo investigados com maior atenção nos últimos anos.

YOUNG & YU (1997) relatam a dificuldade em remover o corante adsorvido ao micélio. Desse modo afirmam que a descoloração é devida a adsorção e degradação. Em nove dias *Trametes versicolor* removeu 92,8% do índigo carmim e *Phanerochaete chrysosporium* 29,8% em meio líquido.

ZHENG et al., (1999) estudaram a descoloração de corantes poliméricos por uma nova cepa de *Penicillium* (ATCC 74414) isolada.

Observaram que houve descoloração rápida do corante polimérico R-478, mas a cor foi lançada subsequente da massa micelial no meio depois de 2-3 dias, indicando que pode ter havido adsorção pelo micélio. Em contraste, a cepa descoloriu continuamente o corante polimérico S-119. O corante era inicialmente adsorvido sobre o micélio e subsequente descolorido sem ser lançado ao meio. Parece que o processo de descoloração envolveu inicialmente adsorção ao micélio e depois biodegradação por metabolismo microbiano e descoloração.

Baseando-se no trabalho de ZHENG et al., (1999) o aumento nos valores da absorbância na maioria dos meios por *Pleurotus sajor caju* (020) e *Phanerochaete chrysosporium*, depois que estes alcançaram o mais baixo valor de descoloração, pode ser um indício de adsorção do corante à massa micelial e este pode ter sido subsequente lançado ao meio. Entretanto, não se deve deixar de considerar que possa ter acontecido um mecanismo de repolimerização.

Na maioria dos corantes presentes no meio 1, com o decorrer do tempo ocorreu a descoloração do micélio, e a nova massa micelial não apresentou cor; isso evidencia a absorção do corante adsorvido com degradação do grupo cromóforo.

VI- CONCLUSÕES

No presente trabalho o acompanhamento por 12 dias dos frascos de ensaio revelou o crescimento de ambos os fungos testados em todos os corantes e em efluente industrial. Observou-se entretanto, um maior crescimento de *Pleurotus sajor caju* (020) na combinação de corantes naturais.

O pH aumentou no meio 1 (cerca de 1 unidade) por *Pleurotus sajor caju* (020) independentemente do corante utilizado. Ocorreu uma leve diminuição no efluente industrial por *Pleurotus sajor caju* (020) e um leve aumento por *Phanerochaete chrysosporium*. No entanto, o pH aparentemente não teve efeito nos corantes ou no seu espectro de absorção.

O teste de DQO apresentou resultados semelhantes para os dois fungos no efluente industrial, sendo a maior redução para *Phanerochaete chrysosporium* 74% contra 69% de *Pleurotus sajor caju* (020). A maior redução das taxas de DQO para o meio 1 foi por *Pleurotus sajor caju* (020) nos corantes azo e na combinação de corantes sintéticos.

As análises enzimáticas revelaram que ambos os fungos exibiram atividades ligninolíticas que variaram com o corante utilizado para o

crescimento. Houve maior produção de peroxidase e lacase nos dois substratos (o-dianisidina e siringaldazina) por *Pleurotus sajor caju* (020).

A descoloração dos corantes sintéticos e da combinação desses corantes ocorreu mais rapidamente para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Para o corante carmim, *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou mais intensa e mais rápida descoloração. A descoloração do urucum hidrossolúvel aconteceu de modo similar para ambos os fungos com desempenho levemente superior da linhagem de *Pleurotus sajor caju* (020). *Phanerochaete chrysosporium* não apresentou capacidade de descoloração no efluente, entretanto, houve excelente descoloração do meio contendo a combinação dos corantes naturais e do efluente por *Pleurotus sajor caju* (020) no 2º dia de crescimento. Tanto no meio 1 quanto no efluente todos os corantes sofreram adsorção em alguma extensão por ambos os fungos. Os dados encontrados em CLAE são coerentes com os encontrados para as análises de espectrofotometria de varredura.

Todos os corantes foram descoloridos em alguma extensão pelos fungos estudados. A eficiência de remoção da cor variou de 50% a 100%. Algumas descolorações foram extremamente rápidas entretanto, alguns corantes foram resistentes à descoloração.

Os resultados ora descritos sugerem que é possível, com a descoloração do resíduo líquido de efluentes das indústrias de corantes através da ação das enzimas de *Pleurotus sajor caju* (020) e *Phanerochaete chrysosporium*, diminuir a descarga poluente referente à presença dos corantes.

O emprego desses fungos de podridão branca justifica-se pela sua capacidade biodegradativa com a produção de várias enzimas hidrolíticas e oxidativas, além de apresentar inúmeras espécies largamente difundidas em todo o planeta, principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

Os diferentes potenciais de degradação entre os dois basidiomicetos testados podem indicar uma possível consorciação entre eles em sistema de tratamento, como maneira de acelerar a remoção da cor em efluentes industriais ou também podem ser adotados como um pré-tratamento na descoloração, combinado com sistemas de tratamento convencionais para reduzir a DQO. Os experimentos apresentados sugerem que os corantes podem servir de fonte de carbono para os fungos basidiomicetos estudados.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M.D.; IRVINE, R.L. Characterization of Reactions Catalyzed by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives Biochemical Biophysic, v. 276, p. 405-414, 1990.

BANAT, M.B.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. Bioresource Technology, v.58, p. 217-227, 1996.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Conversion of Lignin Peroxidase Compound III to Active Enzyme by Cationd Radicals. Archives Biochemical Biophysic, v. 312, p. 511-515, 1994.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environmental Science Technology, v. 28 (2), p. 78-87, 1994.

BORGERDING, A.J.; HITES, R.A. Identification and measurement of food and cosmetic dyes in a municipal wastewater treatment plant. Environmental Science Technology, v. 28 (7), p.1278-1284, 1994.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role of laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters, v. 267, p. 99-102, 1990.

BRITO, I.R.C. Efluentes de refinaria de petróleo: seleção de bactérias autóctones com potencial de biodegradação e redução de toxicidade aguda. Rio Claro, 1996, 166p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

BUMPUS, J.A.; BROCK, B.J. Biodegradation of cristal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v. 54 (5), p. 1143-1150, 1988.

BUMPUS, J.A. Microbial degradation of azo dyes. In: Singh, V.P. Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds. Elsevier Science, p. 157-177, 1995.

BUSWELL, J. A.; ODIER, E. Lignin Biodegradation. CRC Critical Reviews Biotechnology, v. 6, p. 1-60, 1987.

BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J.; CHANG, J.F.; PEBERDY, S.Y.; YU, F.; YU, H.S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.12, p. 537-542, 1996.

CAMMAROTA, M.C. Avaliação de um bio-reator fúngico para remoção de cor do efluente do branqueamento de polp kraft. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.188, 1991.

CETESB – Companhia de Saneamento Ambiental. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, 7p., 1990.

CONTATO, I.M. Emprego de *Aspergillus niger* paramorfogênico para avaliação do grau de interferência dos aditivos químicos na biosorção de corantes têxteis de efluentes industriais. Rio Claro, 1995. 173p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v. 56 (4), p. 1114-1118, 1990.

CROSBY, N.T. Applications of HPLC for the analyses of synthetic food colors. In: Lawrence J.F. Food Constituents and food residues (their chromatographic determination) New York, p. 324, 1984.

DAVIS, S.; BURNS, R.G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. Applied Microbiology Biotechnology, v. 32, p. 721-726, 1990.

De JONG, E.; FIELD, J. A.; DE BONT, J.A.M. Aryl Alcohols in the Physiology of Ligninolytic Fungi. FEMS Microbiology Reviews, v.13, p. 153-188, 1994.

DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYYA, B.C. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. Applied and Environmental Microbiology, v. 60 (11), p. 4216-4218, 1994.

ERIKSSON, K.E.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, New York, 1990.

FUKUSHIMA, Y.; KIRK, T.K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Applied and Environmental Microbiology, v. 61 (3), p. 872-876, 1995.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v.45 (6), p.1741-1747, 1983.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II) - dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Archives Biochemical Biophysic, v. 242, p. 339-341, 1985.

GOLD, M.H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Biocatalysis in Agrochemical

Biotechnology (Whitaker, J. R., Sonnet, P. E. eds). ACS Symp. Series, Am. Chem. Soc. Washington, DC., v. 389, p. 127-140, 1989.

GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiology Reviews, v. 57 (3), p. 606-622, 1993.

GOSZCZYNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRYGSBY, M.B.; CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Journal Bacteriology, v. 176, p. 1339-1347, 1994.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, p. 125-135, 1994.

HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON J.D. (Ed.) Natural food colorants. AVI, 1992, p. 40.

- HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; SOLIVERI, J.; COPA, J.C.; PÉREZ, M.;
ARIAS, M. Paper mill effluent decolorization by fifty *Streptomyces* strains.
Applied and Environmental Microbiology, v. 60 (11), p. 3909-3913, 1994.
- HIGUSHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. Wood
Science Technology, v. 24, p. 23, 1990.
- JALÓN, M.; PEÑA, M.J.; RIVAS, J.C. Liquid chromatographic determination
of carminic acid in yogurt Journal Association Official Analytical
Chemistry, v. 72 (2), p. 231-234, 1989.
- KATAGIRI, N.; Y. TSUTSUMI.; T. NISHIDA. Correlation of brightening
with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during
biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state
fermentation system. Applied and Environmental Microbiology, v. 61 (2),
p. 617-622, 1995.
- KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during
solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete*

chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology, v. 58 (4), p. 1121 – 1127, 1992.

KEREM, Z.; HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. Applied and Environmental Microbiology, v. 61 (8), p. 3057-3062, 1995.

KERSTEN, P.J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K.E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T.K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. Biochemistry Journal v. 268, p. 475-480, 1990.

KIRBY, N.; MULLAN, G.M.; MARCHAT, R. Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology Letters, v. 17 (7), p. 761-764, 1995.

KIRK, T.K.; TIEN, M. Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Investigations with non-phenolic model compounds. Recent Advances in Lignin Biodegradation Research, Tokyo: Uni, p. 233-245, 1983.

KNAPP, J.S.; NEWBY, P.S.; REECE, L.P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. Enzyme and Microbial Technology, v. 17, p. 664-668, 1995.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

LANG, E.; NERUD, F.; NVOTNÁ, E.; ZADRAZIL, F.; MARTENS, R. Production of ligninolytic exoenzymes and ¹⁴C-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose substrate. Folia Microbiologica, v. 41 (6), p. 489-493, 1996.

LEATHAM, G.F. The ligninolytic activities of *Lentinula edodes* e *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology Biotechnology, v. 24, p. 51-58, 1986.

LEISOLA, M.S.A. & FIECHTER, A. New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. Advances in Biotechnological Processes. New York, Alan R. Liss Inc. p. 59-89, 1985.

LLEWELLYN, B.D. Stainsfile-arylmethane dyes. Disponível na Internet: [WWW.http://members.pgonline.com/~bryand/dyes/class/clsarylm.htm](http://members.pgonline.com/~bryand/dyes/class/clsarylm.htm)
[WWW.http://members.pgonline.com/~bryand/dyes/class/mordant.htm](http://members.pgonline.com/~bryand/dyes/class/mordant.htm)
14set.1998.

MARZULLO, L.; CANNIO, R.; GIARDINA, P.; SANTINI, M.T.; SANNIA, G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. The Journal of Biological Chemistry, v. 270 (8), p. 3823-3827, 1995.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. Phytochemistry, v. 26, p. 11-20, 1987.

NAZARÉ, R.F.R. Potencialidade de plantas amazônicas produtoras de corantes naturais. Disponível na Internet WWW.<http://sudoesteuesb.br/sbcn/amazonia.html>. 14 set. 1998.

OLLIKA, P.; ALHONMÄKI K.; LEPPÄREN, V.M.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v. 59 (12), p. 4010-4016, 1993.

ORTH, A.B.; ROYSE, D.J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology, v. 59 (12), p. 4017-4023, 1993.

PASTI-GRYSGBY, M.B.; PASZCYNski, A.; GOSZCYNski, S.; CRAWFORD, D.L.; CRAWFORD, R.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v. 58 (11), p. 3605-3613, 1992.

PASZCYNski, A.; PASTY-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKY, S.; CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Applied and Environmental Microbiology, v.58 (11), p. 3598-3604, 1992.

PASZCYNski, A.; HUYNH, V.B.; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters, v. 29, p. 37-41, 1985.

PODGORNIK, H.; GRGIC, I.; PERDIH, A. Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Chemosphere, v. 38 (6), p. 1353-1359, 1999.

RAJARATHANAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* Mushrooms. Part III: biotransformations of natural lignocelulosic wastes; commercial applications and implications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, New York, v.28 (1), p. 31-113, 1989.

REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, p. 137-152, 1994.

ROUSEFF, R.L. High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. Journal of Food Science, v. 53 (6), p. 1823-1826, 1988.

SANI R.K.; AZMI W.; BANERJEE U.C. Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. Folia Microbiologica, v. 43 (1), p. 85-88, 1998.

SAYADI S.; R. ELLOUZ. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. Applied and Environmental Microbiology, v. 61 (3), p. 1098-1103, 1995.

SCHOEMAKER, H.E.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A.; PIONTEK, K. The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignins models and lignin by

lignin peroxidase: The redox cycle revisited. FEMS Microbiology Reviews, v. 13, p. 21-332, 1994.

SEMPLE, K.T.; FERMOR, T.R. The bioremediation of xenobiotic-contamination by composts and associated microflora. Science and Cultivation of Edible Fungi, Oxford, Proceedings of the 14 th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi. p. 917-924, 1995.

SHIN K.S.; KIM C.J. Decolorization of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters, v. 20 (6), p. 569-572, 1998.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, v. 58 (8), p. 2397- 2401, 1992.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycologia v. 81, p. 234-240, 1989.

TAKAHASHI, M.Y. Monografia de corantes naturais para fins alimentícios : padrões de identidade e qualidade. 2^a edição, São Paulo: p. 8-22, 1987.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. Microbiology (UK), v. 140, p. 19, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science v. 221, p. 661-663, 1983.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Science, USA v. 81, p. 2280-2284, 1984.

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, p. 1-17, 1995.

VYAS, B.R.M.; MOLITORIS, H.P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*

in the decolorization of remazol brilliant blue R. Applied and Environmental Microbiology, v. 61 (11), p. 3919-3927, 1995.

VYAS, B.R.M.; VOLC, J.; SASEK, V. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Folia Microbiologica, v. 39 (1), p. 19-22, 1994.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*. Journal Biology Chemistry, v. 267, p. 23688, 1992.

WASHINGTON, D.C., Official methods of analysis. 12⁰ Ed. Association of Official Analytical Chemistry, 1975.

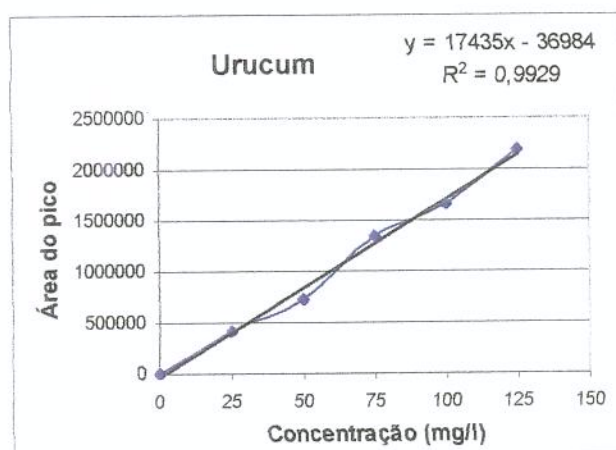
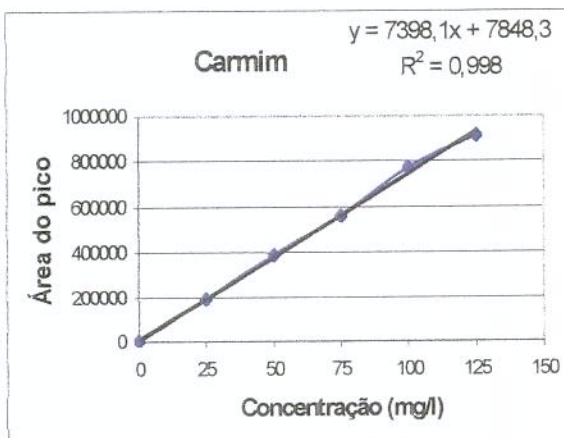
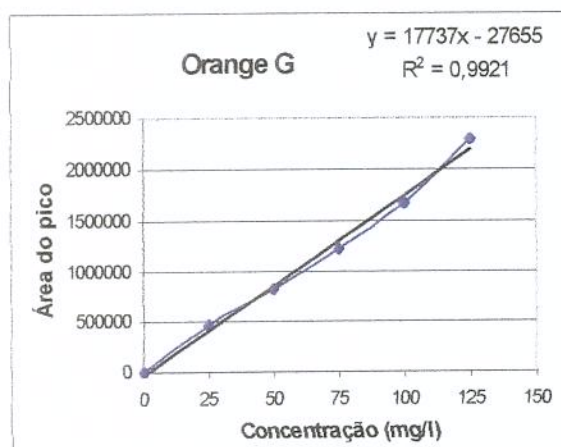
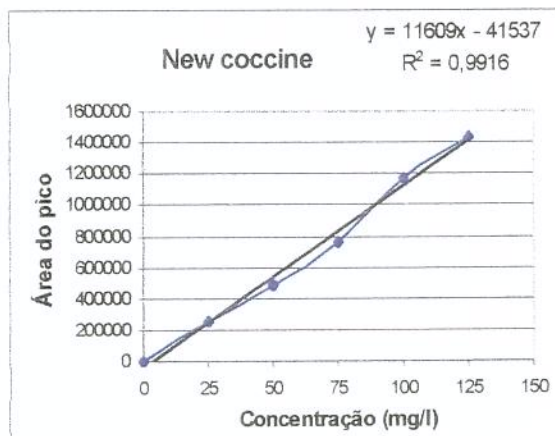
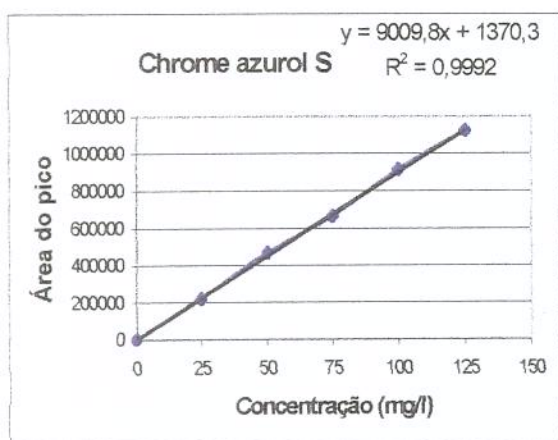
YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. Water Research, v. 31 (5), p. 1187-1193, 1997.

ZGHAL, H.; GUETTIN, C.; HALQUI, E.; CZCHOC, M. Determination of sunset yellow FCF and ponceau 4R in sweets by high performance liquid chromatography. Science des Aliments, v. 15, p. 491-496, 1995.

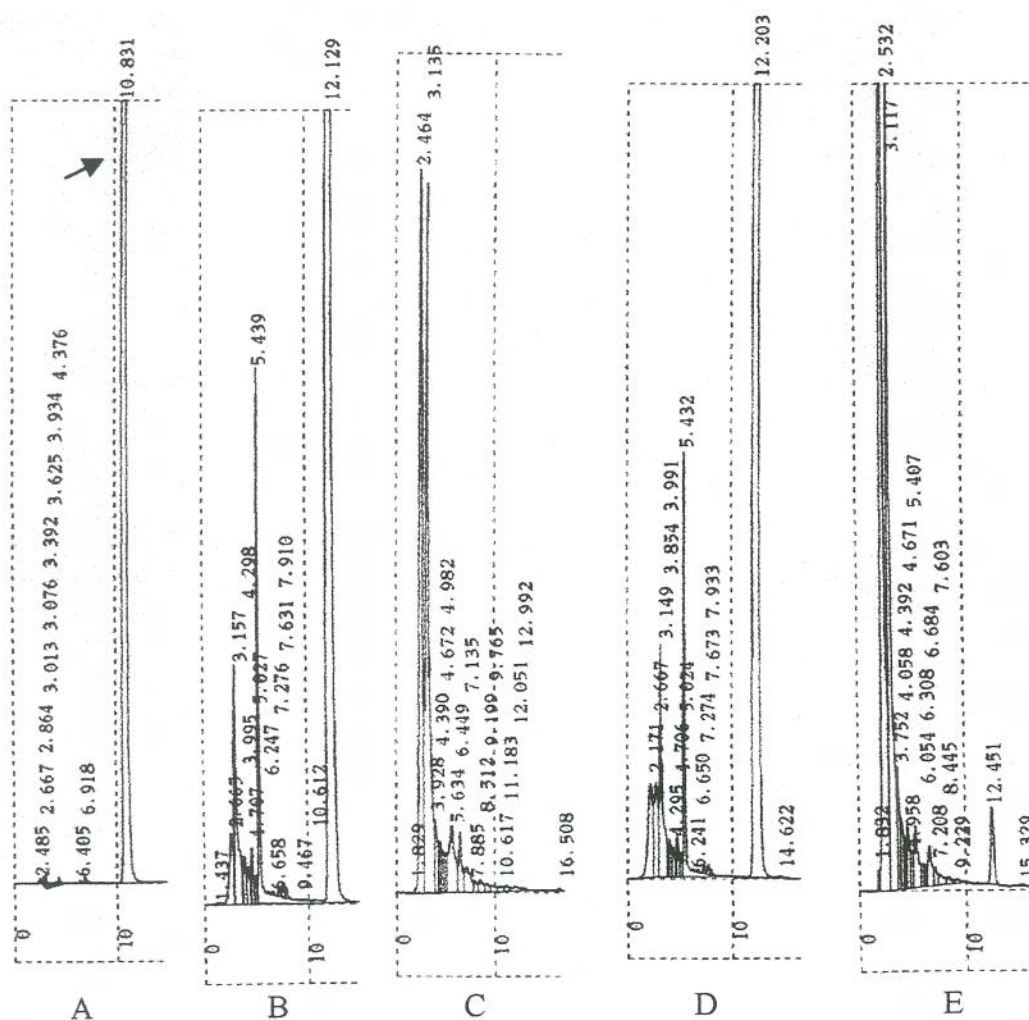
ZHENG, Z.X; LEVIN, RE; PINKHAM, J.L.; SHETTY, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. Process Biochemistry, v. 34 (1), p. 31-37, 1999.

VIII – ANEXOS

1- Curva Padrão dos corantes



2- Cromatograma do corante *New Coccine*



CLAE : Fase móvel – Tampão fosfato/metanol (3:1) pH 6,8

Vazão: 0,5mL/min

Detecção: 307 nm

A: Padrão do corante *New Coccine* (100 mg/L)

B: Controle *Phanerochaete chrysosporium* 4 dias de crescimento

C: Amostra *Phanerochaete chrysosporium* 4 dias de crescimento

D: Controle *Pleurotus sajor caju* (020) 12 dias de crescimento

E: Amostra *Pleurotus sajor caju* (020) 12 dias de crescimento

Phanerochaete chrysosporium

Legenda: (a numeração nas fotos corresponde ao dia de crescimento)

MSC - Combinação de corantes sintéticos - controle

MS - Combinação de corantes sintéticos - amostra

NCC - *New coccine* - controle

NC - *New coccine* - amostra

OGC - *Orange G* - controle

OG - *Orange G* - amostra

CAC - *Chrome azurol S* - controle

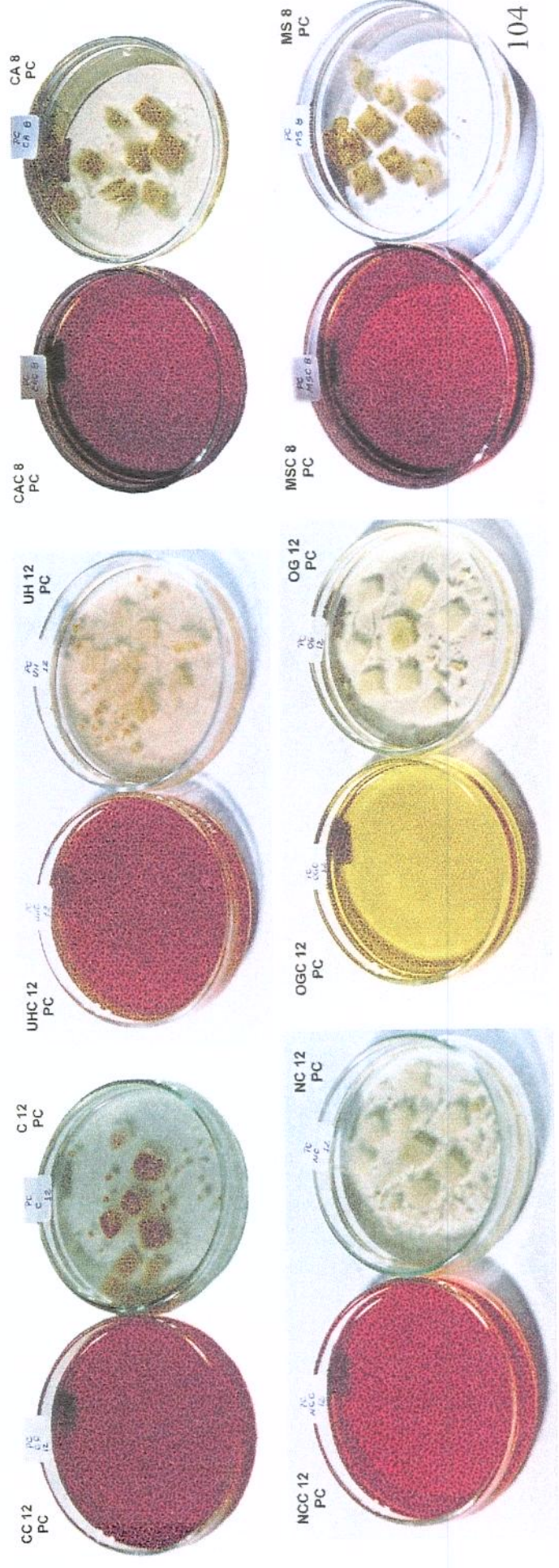
CA - *Chrome azurol S* - amostra

CC - Carmim - controle

C - Carmim - amostra

UHC - Urucum hidrossolúvel - controle

UH - Urucum hidrossolúvel - amostra



Pleurotus sajor caju (020)

Legenda: (a numeração nas fotos corresponde ao dia de crescimento)

MSC - Combinação de corantes sintéticos - controle

MS - Combinação de corantes sintéticos - amostra

NCC - *New coccine* - controle

NC - *New coccine* - amostra

OGC - *Orange G* - controle

OG - *Orange G* - amostra

CAC - *Chrome azurol S* - controle

CA - *Chrome azurol S* - amostra

CC - Carmim - controle

C - Carmim - amostra

UHC - Urucum hidrossolúvel - controle

UH - Urucum hidrossolúvel - amostra

MNC - Combinação de corantes naturais - controle

MN - Combinação de corantes naturais - amostra

