



II-104 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE CORANTES POR FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA PARA APLICAÇÃO NO PROCESSO DE FILTRAÇÃO LENTA

Illian de Freitas e Felix de Sousa⁽¹⁾

Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Goiás, 2008.

Mariangela Fontes Santiago⁽²⁾

Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas (11/1999) e mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (2/1993). Atualmente é Revisor da Revista Eletrônica da Faculdade de Farmácia e professor associado I da Universidade Federal de Goiás. Membro do programa de pós-graduação da Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás, tendo experiência nas áreas de Bioquímica e Microbiologia.

Maria Margareth Gonçalves Lopes⁽³⁾

Farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás. Especialista em tratamentos de resíduos sólidos e líquidos (UFG) Mestre em Engenharia Ambiental (UFG).

Fernanda Neiva Uto⁽⁴⁾

Bióloga pela Universidade Estadual de Goiás. Gestora Ambiental pelo CEFET-GO. Mestranda em Engenharia Ambiental (PPGEMA-UFG).

Endereço⁽¹⁾: SHIN QI 01 Conjunto 06 Casa 06 - Lago Norte - Brasília - DF - CEP: 71505-060 - Brasil - Tel (61): 3468-1594 - e-mail: illian.felix@gmail.com

Endereço⁽²⁾: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Tecnologia Farmacêutica. Praça Universitária esquina com primeira avenida- Setor Universitário - Goiânia, GO - CEP: 74605-220 -Brasil - Caixa-Postal: 131 - Telefone: (62) 2096461 Fax: (62) 2096037 e-mail: mariangelafs@gmail.com URL da Homepage: <http://www.farmaciaci.ufg.br>

Endereço⁽³⁾: Rua T-36, 1477 - Setor Bueno - Goiânia - GO - CEP: 74223-050 - Brasil - e-mail: Margareth@ortoevidente.com

Endereço⁽⁴⁾: Av T63 qd 02b lt15 Bairro Anhanguera - Goiânia - GO. e-mail: fernanda.uto@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho visa o estudo comparativo da biodegradação de corantes artificiais por fungos de degradação branca para identificação da melhor espécie a ser aplicada na filtração lenta, o experimento foi baseado no cultivo de cinco fungos de decomposição branca em meio líquido, o qual era constituído por corantes artificiais e água de poço. A amostragem periódica permitiu a determinação das atividades enzimáticas de Lacase (Lcc), Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP) e a verificação da descoloração dos corantes. Os corantes utilizados foram FD & C Azul N° 2 Indigotina, Vermelho N° 6 Ponceaux 4R, FD & C Amarelo N° 6. Para o corante azul, em 9 dias de cultivo, com uma biomassa maior, a espécie *Trametes versicolor* (Tve) removeu 93,5% da cor. As espécies *Phanerochaete chrysosporium* (PC) e *Pycnoporus sanguineus* (PS) também se destacaram em termos de biodegradação, removendo, respectivamente, 83,7 e 81,5% da cor. Destaca-se a atividade da Lcc, cujas das espécies Tve e PS foram as maiores produtoras, respectivamente, 3,6 e 3,3 U.mL⁻¹. Para o corante vermelho, as atividades de MnP oriundas de todos os fungos, cultivados com uma biomassa menor, apresentaram comportamento semelhante: até o sexto dia de cultivo, aumentaram; no sétimo dia, anularam-se ou se aproximaram de zero; do sétimo em diante novamente aumentaram. Em termos de Lcc, a espécie Tve, com uma biomassa maior, produziu mais. A produção atingiu o valor de 3,5 U.mL⁻¹. Nenhuma das outras espécies produziu tanto quanto esta nas mesmas condições. A produção de LiP foi semelhante ao demonstrado para a MnP, não detectadas atividades no sétimo dia de cultivo. Em ambas as condições de biomassa, as espécies demonstraram haver ação enzimática. *Trametes villosa* (Tvi) e Tve destacaram-se quanto à descoloração, removendo, respectivamente, 68,8 e 83,2% da cor em 22 dias. Para o corante amarelo, as espécies PS, PC, Tvi e *Lentinus edodes* antigiraram altos valores de produção de LiP, respectivamente, 12,0, 5,0, 7,0 e 10,0 U.mL⁻¹. Somente o Tve destacou-se em termos de descoloração: removeu 55,4% em 21 dias. Em relação aos resultados dos ensaios em meio líquido, a espécie Tve, foi a que apresentou a melhor capacidade de descolorir, sendo selecionada para aplicação em sistemas de filtração lenta. O corante Indigotina foi transferido a uma concentração equivalente à metade daquela adotada para os ensaios em meio líquido. Foram avaliados os parâmetros cor, turbidez e atividade enzimática. A



remoção de cor foi bastante satisfatória, porém a turbidez aumentou em função do crescimento da biomassa ao longo do tempo.

PALAVRAS-CHAVE: Descoloração, Filtração Lenta, Lacase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase.

INTRODUÇÃO

Diante da ampla utilização de corantes sintéticos em escala industrial, com destaque para o setor têxtil, há uma vasta contaminação ambiental de rios e lagos, resultante da descarga de efluentes. O sistema de tratamento já existente à base de microflora não é suficiente, uma vez que os corantes são resistentes à degradação. A degradação anaeróbica promovida pelas bactérias produz produtos carcinogênicos. Todavia, já há estudos que indicam a capacidade de adsorção de corantes pela biomassa de fungos, como por exemplo o *Aspergillus niger*. Esta técnica utilizada para biorremediação de águas residuárias apresenta obstáculos. Opta-se, pois, por outros caminhos biotecnológicos, como a utilização de fungos de decomposição branca capazes de reduzir a toxicidade ao meio ambiente (2). Estes esforços no sentido de encontrar formas alternativas de tratamento justificam-se, uma vez que a produção total anual de corantes têxteis é estimada em 800 Kton (14).

Há estudos que apresentam a aplicação das espécies *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* para a descontaminação de solos. Foi demonstrado que a primeira espécie, quando cultivada conjuntamente com as bactérias provenientes dos solos ou com fungos do gênero *Trichoderma*, é mais eficaz no processo de biodegradação de xenobióticos e, assim, capaz de produzir em maior quantidade a enzima lacase (3).

O *Trametes versicolor* é uma espécie excelente para ser utilizada no tratamento de efluentes industriais. Cultivado em meio líquido a base de glicose e peptona, observou-se que o período ideal para transferência do efluente ao meio líquido corresponde ao 12ª dia de crescimento da biomassa. Período este em que o fungo apresenta elevada produção enzimática. Somado a isso, é de conhecimento que o nitrogênio é um componente nutricional do meio que se comporta como importante fator regulador da atividade ligninolítica. Também é de conhecimento que o guaiacol, como indutor enzimático, é capaz de elevar a atividade enzimática em 780%, além de não inibir o crescimento da biomassa (11).

O *Trametes villosa* também apresenta um amplo potencial biotecnológico, uma vez que age sobre um amplo espectro de corantes têxteis. Por exemplo, para o corante Drimaren Brilliant Blue, foi demonstrado que, em meio líquido a base de extrato de malte e do corante sujeito à agitação, a descoloração é favorecida. Não somente a agitação influencia a descoloração, como também a concentração do corante. Em maiores concentrações, o percentual de remoção de cor é maior. Já para a espécie *Pycnoporus sanguineus*, o mesmo corante, quando presente no meio, estimula seu crescimento – um indicio de que o corante é utilizado como fonte de carbono. Durante os primeiros dias de cultivo, esta espécie descoloriu mais rapidamente que o *T.villosa* (9).

O *Lentinus edodes*, cultivado em meios de cultura sólidos a base de milho como substrato, foi testado quanto a sua habilidade de degradar corantes, estes a uma concentração de 200 ppm (experimentos *in vivo*). Também foi sujeito a experimentos *in vitro*, em cujo meio de cultura foram adicionados componentes reacionais para determinação da atividade da manganês peroxidase, o sulfato de manganês ($MnSO_4$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o tampão malonato de sódio. Os corantes foram adicionados ao meio, separadamente, a uma concentração de 50 ppm. Observou-se, *in vivo*, após 14 dias de cultivo, máxima descoloração acompanhada de máxima produção de manganês peroxidase. *In vitro*, redução da capacidade de descolorir quando ausentes os componentes básicos da reação enzimática, $MnSO_4$ e H_2O_2 (4).

De acordo com Di Bernardo (1993) o processo de filtração é um sistema biológico, constituído por uma caixa de areia e meio suporte onde ocorrem dois principais mecanismos de remoção de microrganismos e sólidos em suspensão. Sendo o primeiro o processo físico de coar e o segundo e mais importante o processo biológico que se instala ao longo do leito filtrante e é composto de bactérias, algas, protozoários, invertebrados e seus produtos extracelulares. Tratando-se, pois, de uma comunidade heterogênea com atividade complexa. (13).

Como elementos constituintes do sistema de filtração lenta, além do leito de areia, há uma camada sobrenadante de água, capaz de exercer uma pressão que carrega a água através do filtro, e uma camada suporte, composta de pedregulhos, sob a camada de areia. Quando introduzida a água proveniente de condições naturais no sistema, as partículas mais pesadas da matéria orgânica suspensa começam a precipitar e



as menores aglutinam-se, tornando-se assim, mais acessíveis para a remoção. As possíveis algas e bactérias presentes nesta água são consumidas pelo “schmutzdecke”, formando-se, então, sais inorgânicos. Também ocorre degradação de compostos nitrogenados e oxidação do nitrogênio. Consequentemente, parte da cor da água é removida e algumas partículas suspensas inertes são filtradas (6).

Quando a água apresenta elevada turbidez, a carreira de filtração é menor e o filtro precisa de uma limpeza adequada. Os sólidos suspensos e o material coloidal são depositados no topo do leito de areia. Se raspada a camada superficial do leito a uma profundidade de 1 a 2 cm, estas partículas são removidas. Para taxas de filtração na faixa de 5 a 15 m³.m⁻².h⁻¹, o tamanho dos grãos de areia aplicado é de 0,6 a 2,0 mm. Para estas condições, os interstícios entre os grânulos são largos, e assim, há menos resistência à passagem da água. Além disso, as impurezas são depositadas mais rapidamente (6).

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos: as espécies de fungos testadas são *Lentinus edodes* – Le (CCT-4519), *Phanerochaete crysospodium* – PC (CCT-1999), *Pycnoporus sanguineus* – PS (CCT-4518), *Trametes versicolor* – Tve (CCT-4521) e *Trametes villosa* – Tvi (CCT-5567). As cepas foram cedidas pela fundação André Tosello Campinas.

Meios de cultura:

a) Meio ágar batata (BGA): preparado em placas de petri. É composto de 50 mL de caldo de batata, 5 g de glicose, 3,75 g de ágar. Completa-se o volume com água destilada para 250 mL;

b) Meio líquido: constituído de água de poço da Escola de Engenharia Civil da UFG.

Corantes: FD & C Amarelo Nº 6 Crepúsculo; FD & C Azul Nº 2 Indigotina e Vermelho Nº 6 Ponceaux 4R. À uma concentração de 0,01%.

Condições gerais de cultivo: em erlenmeyers de 250 mL foi transferido 125 ml de água de poço e feito o repique de 5 a 50 discos (5 mm de diâmetro) de fungos, cultivados em condições estáticas por um período médio de 20 dias sob temperatura ambiente (28 a 30° C). O extrato bruto produzido era centrifugado a 2000 rpm por 10 min e filtrado em papel de filtro comum (14 µm), de espessura 205 µm, para posterior leitura da cor.

a) Corante Azul Indigotina: de 5 a 20 discos de micélio. O meio líquido foi mantido à temperatura ambiente por um período médio de 26 dias.

b) Corante Vermelho Ponceaux: de 20 a 50 discos de micélio. O meio líquido foi mantido à temperatura ambiente por um período médio de 20 dias.

c) Corante Amarelo Crepúsculo: 20 discos de micélio. O meio líquido foi mantido à temperatura ambiente por um período médio de 21 dias.

Determinação da atividade enzimática (por espectrofotometria):

1. Componentes da reação da Lacase (Lcc – 525 nm): 0,6 ou 0,4 mL do extrato bruto; 0,3 ou 0,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0; 0,1 mL de seringaldazina 1,0 mmol.L⁻¹, solubilizada em etanol. A reação é acompanhada durante 5 min - $\epsilon_{525\text{ nm}} = 65000\text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (SZKLARZ et al, 1989 – modificado);
2. Componentes da reação da Lignina Peroxidase (LiP – 310 nm): 0,6 mL do extrato bruto; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 2,0 mmol.L⁻¹ e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mmol.L⁻¹ solubilizada em tampão tartarato de sódio 0,4 mol.L⁻¹ pH 3,0. A reação é acompanhada durante 5 min - $\epsilon_{310\text{ nm}} = 9300\text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (TIEN e KIRK, 1984);
3. Componentes da reação da Manganês Peroxidase (MnP – 610 nm): 0,5 mL do extrato bruto; 0,1 mL de lactato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹; 0,2 mL de albumina bovina 0,5 %; 0,05 mL de sulfato de manganês (MnSO₄) 2,0 mmol.L⁻¹; 0,05 mL de uma solução de H₂O₂ 2,0 mmol.L⁻¹ solubilizada em tampão succinato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 4,5; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% e 0,04 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 mmol.L⁻¹ – para parar a reação. A mistura é incubada em banho-maria a 30°C durante 5 min (KUWAHARA et al, 1984).



Atividade enzimática: Lcc e LiP (U.mL^{-1}); MnP [$\Delta\text{Abs.}(\text{mL.min})^{-1}$]. A Unidade U é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de $1\mu\text{mol}$ de produto por min.

Determinação da cor (por espectrofotometria): seguiu-se a diluição de 1:8 (x:y), onde x é o volume em mL coletado do extrato bruto e y o volume em mL de água destilada. Para os ensaios, a concentração dos corantes utilizada foi de 0,01%. Determinou-se os espectros de absorção dos corantes na faixa de comprimento de onda (λ) de 370 a 700 nm.

Experimentos:

a) Corante Azul Indigotina:

1ª Experimento (5 discos): para cada espécie, o micélio foi cultivado em uma placa de Petri e em dois Erlenmeyers – ambos os meios líquidos com o corante solubilizado. Durante 25 dias, a descoloração foi monitorada.

2ª Experimento (20 discos): para as espécies Tve, PS, Le e PC, o micélio foi cultivado em duas placas de Petri. Para o Tvi, o dobro de placas. Repicou-se para dois tipos de meio líquido (total de vinte Erlenmeyers, quatro para cada espécie): com e sem o corante solubilizado. A descoloração foi monitorada por um período de 9 dias. Para ambos os tipos de meio líquido, o repique foi feito em duplicata.

b) Corante Vermelho Ponceaux:

1ª Experimento (20 discos): para cada espécie o micélio foi cultivado em duas placas de Petri e em dois Erlenmeyers. O corante foi adicionado a todos os meios líquidos (total de dez Erlenmeyers). A descoloração foi monitorada por um período de 17 dias.

2ª Experimento (50 discos): para as espécies Tve, PS, Le e PC, o micélio foi cultivado em duas placas de Petri. Para o Tvi, o dobro de placas. O corante foi adicionado a todos os meios líquidos (total de 10 Erlenmeyers, para cada espécie em duplicata). A descoloração foi monitorada por 22 dias.

RESULTADOS

1. PRIMEIRO EXPERIMENTO (5 DISCOS):

A Figura 1 mostra a comparação entre as atividades das espécies estudadas. As espécies de fungos requerem mais tempo para remover um percentual significativo de co, quando a biomassa é menor. Somente o Le foi capaz de remover mais que 50%. A ordem decrescente de descoloração é: Le > Tvi > PC > PS > Tve. Respectivamente: 57,8% > 41,5% > 36,3% > 23,8% > 22,4% (Fig. 2).

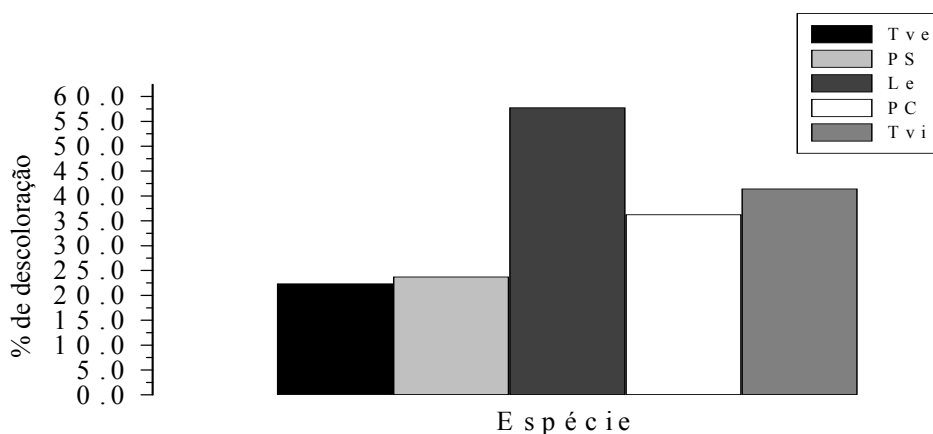


Figura 1: Percentual de descoloração comparado para todas as espécies durante 25 dias.



2. SEGUNDO EXPERIMENTO (20 DISCOS):

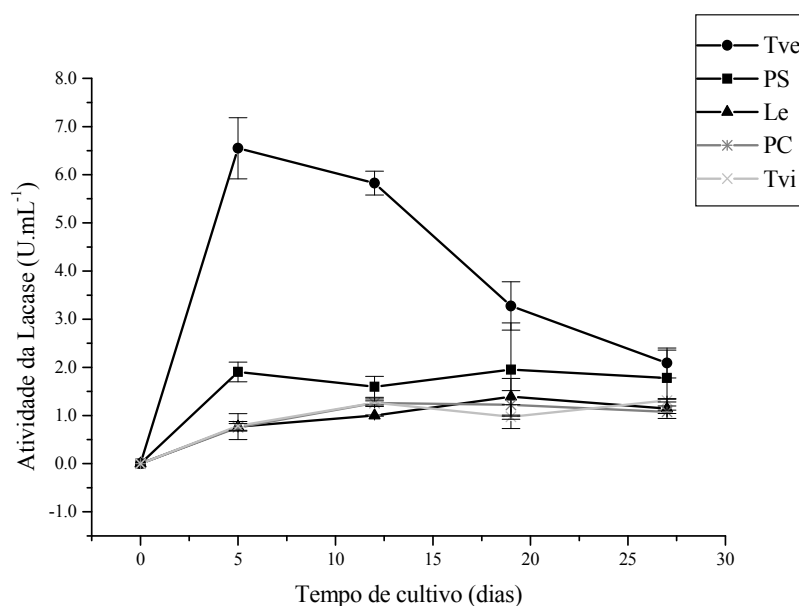


Figura 2: Atividades da Lacase (U.mL⁻¹) determinadas de todas as espécies repicadas (20 discos) em meio líquido (água de poço) sem o corante Azul Indigotina, monitoradas durante 27 dias de cultivo.

As substâncias húmicas (HS) presentes na água são uma mistura de compostos aromáticos, ácidos graxos e orgânicos, hidrofílicos, provenientes da degradação da matéria orgânica. Na presença de radical hidróxido (OH^{\cdot}), os fungos de decomposição branca são capazes de converter compostos que não são fenólicos para fenólicos, por exemplo, as substâncias mencionadas. Após a conversão, as espécies produzem Lcc e MnP, as enzimas responsáveis por posterior oxidação (1). Possivelmente por esta razão o Tve durante os primeiros dias de cultivo, sem o corante – a atividade da Lcc atingiu 6,5 U.mL⁻¹ no quinto dia de cultivo (Fig. 2). Essas fontes de carbono são de grande importância para os fungos, uma vez que proporcionam energia para a manutenção do metabolismo (12).

Comparado as outras espécies, o Tve produziu mais Lcc ao longo dos dias. Atingiu pico de produção no quinto dias. PS e Le, no décimo nono. PC e Tvi, no vigésimo sétimo. PS foi o segundo melhor produtor de Lcc – a atividade atingiu 1,9 U.mL⁻¹, o pico. Somente a atividade do Tve demonstrou uma grande tendência de queda após o quinto dia (Fig. 2). A partir deste momento até o último dia de cultivo, as fontes de carbono, os compostos aromáticos presentes na água de poço, foram consumidas. Em outras palavras, o substrato da enzima reduziu. Por este motivo, a atividade decresce. Além disso, manteve-se alta – 3,2 U.mL⁻¹ – durante dezenove dias (Fig. 2). Então, o fungo manteve um intenso metabolismo durante todo o tempo.

Por outro lado, as atividades das espécies Le e PC demonstraram uma tendência de crescimento, respectivamente, até o décimo nono e décimo segundo dias. Mas seus metabolismos não foram tão intensos. A atividade do PS manteve-se entre 1,5 e 1,9 U.mL⁻¹. Este fungo possivelmente apresentou um metabolismo estacionário após o quinto dia (Fig. 2). Outro aspecto que pode possivelmente explicar porque o PS foi o segundo melhor produtor é que esta espécie produz um pigmento natural, a cinabarina, um antibiótico. Uma vez que o meio líquido não foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos, possíveis bactérias estariam presentes na água. A fim de eliminá-las, o fungo produziu cinabarina. A produção de Lcc pode ser correlacionada a este pigmento (4). A atividade do Tvi também demonstrou tendência de crescimento – atingiu 1,3 U.mL⁻¹, o pico. Esta é a única espécie cujo metabolismo aproximou-se mais daquele apresentado pelo PS (Fig. 2).

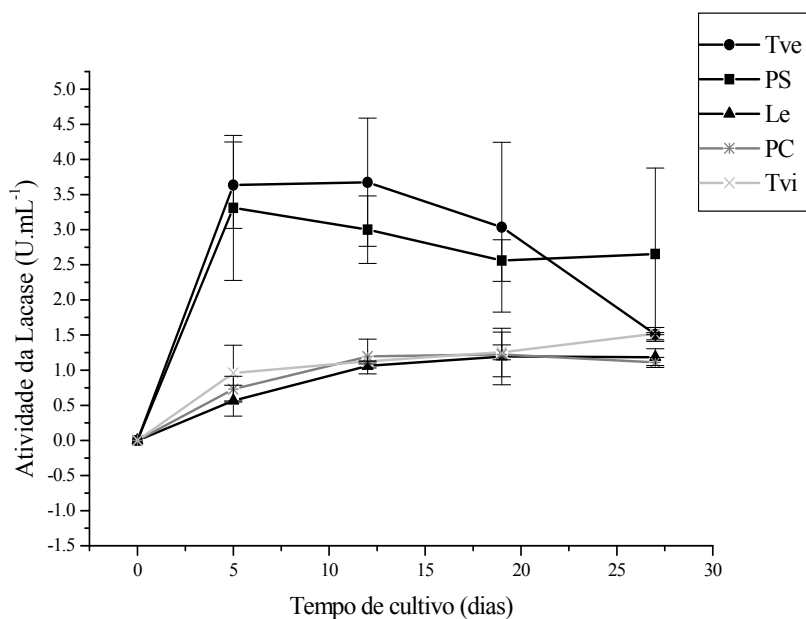


Figura 3: Atividades da Lacase (U.mL⁻¹) determinadas de todas as espécies repicadas (20 discos) em meio líquido (água de poço) com o corante Azul Indigotina, monitoradas durante 27 dias de cultivo.

Durante todo o tempo de cultivo, a atividade da Lcc do Tve, quando presente o corante, se comparada àquela quando ausente, foi menor. Também demonstrou uma tendência de queda após o quinto dia (Fig. 3). A enzima possivelmente contribui para a oxidação, degradação, do corante. A atividade enzimática do fungo removeu 93,5% da cor em nove dias (Fig. 4). Aparentemente atingindo 100% da cor removida em doze dias. Então, o corante poderia ser uma fonte de carbono que gerou energia. Após o décimo segundo dia, uma vez que o fungo manteve altos níveis de atividade enzimática, o corante Azul Indigotina foi possivelmente degradado completamente, decaindo do décimo segundo ao vigésimo sétimo dia.

Quando o Indigotina estava presente, a atividade da Lcc do PS foi maior durante todos os dias de cultivo. Semelhante ao Tve, o pico de produção foi no quinto dia – 3,3 U.mL⁻¹. Demonstrando uma tendência de queda a partir deste dia até o décimo nono. Posteriormente, até o último, praticamente manteve-se constante (Fig. 3). Em nove dias, o percentual de descoloração foi 81,5%. Em intervalos de três ou quatro dias, o fungo removeu aproximadamente 20% da cor (Fig. 4). Então, em doze dias, o percentual atingiu 90%, enquanto a atividade manteve-se com altos valores. Até este dia, o Indigotina foi um possível substrato. Portanto, a descoloração ocorreu enquanto a enzima foi produzida em significativas quantidades – 3,0 U.mL⁻¹. Lcc e pode ter contribuído para a oxidação do corante, mesmo demonstrando queda de atividade a partir do quinto dia. A enzima possivelmente contribui mais para a degradação do Indigotina que para a oxidação das HS.

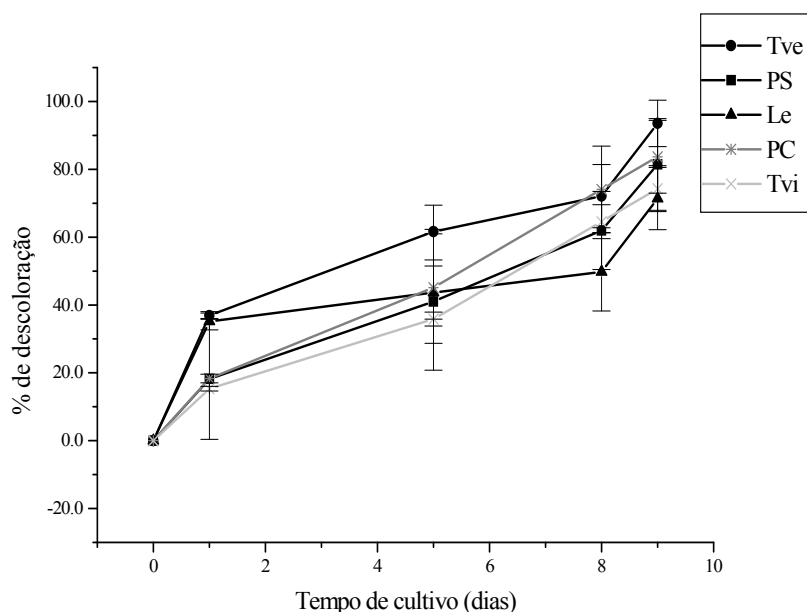


Figura 4: Percentuais de descoloração comparados para todas as espécies durante nove dias de cultivo (biomassa de 20 discos repicados em meio líquido).

A atividade da Lcc do Le quando presente o composto colorido foi semelhante (Fig. 3), ao comportamento quando ausente. Esta enzima demonstrou tendência de crescimento durante todo o tempo (Fig. 3). Em um dia, o fungo removeu 35,1% da cor. Em cinco dias, 43,6%. Em oito, 49,7%. Em nove, 71,4% (Fig.4). Ainda havia 28,6% da cor a ser removida durante os próximos dias. A descoloração continuou, enquanto a atividade enzimática aumentou. Os valores das atividades de ambos os tipos de meios líquidos foram bastante semelhantes durante todo o tempo de cultivo. Então, não é possível sugerir para qual degradação a enzima contribui mais – oxidação das HS ou do corante. Mas, uma vez que a atividade se mantém em crescimento enquanto o fungo descolore, há indicativo de que a Lcc contribuiu para a oxidação do Indigotina. Este composto poderia estar sendo usado pelo fungo como uma fonte de carbono para o metabolismo.

As atividades da Lcc oriundas de ambos os meios líquidos do PC demonstraram um comportamento bastante similar uma vez que os valores são muito próximos, não se pode afirmar qual a enzima ou via de oxidação contribui mais na degradação do corante. Até o décimo nono dia, a atividade apresentou tendência de crescimento (Fig. 3). Em intervalos de três ou quatro dias, o fungo descoloriu entre 26,0 e 27,0%. Em nove dias, atingiu um percentual de 83,7% da cor removida (Fig.4). Ainda havia 16,3% da cor para remover nos próximos dias. A descoloração continuou. Em outras palavras, semelhante ao demonstrado pelo PS. Uma vez que até o décimo nono dia a Lcc foi produzida continuamente, a atividade pode ser correlacionada à descoloração. O fungo pode ter usado o corante como uma fonte de carbono, degradando-o por meio da produção da enzima.

Durante todo o tempo de cultivo, a atividade da Lcc oriunda do meio líquido com corante solubilizado em que foi repicada a espécie Tvi foi maior, se comparada à produção oriunda do outro meio. Portanto, a enzima pode ter contribuído mais para a oxidação do Indigotina. Também, durante todos os dias, a produção enzimática demonstrou tendência de crescimento (Fig. 3). Entre três ou quatro dias, o fungo descoloriu 24,5%. Em nove dias, atingiu um percentual de 74,3% da cor removida. (Fig. 4). Ainda havia 25,7% da cor para remover até o último dia de cultivo. O Tvi continuou a descoloração gradualmente. Enquanto o fungo descoloriu o meio líquido, a atividade enzimática demonstrou contínuo crescimento. Então, é possível correlacioná-la com a descoloração. A Lcc possivelmente degradou o composto colorido. Pode ter sido usado como nutriente para gerar energia.

O Tvi, sob condições estáticas, foi capaz de descolorir aproximadamente 40 % durante dez dias. O corante testado foi o *Drimaren Brilliant Blue* (9). O percentual de descoloração encontrado para o Azul Indigotina foi próximo a este valor durante um período de tempo similar – oito dias.

A ordem decrescente de descoloração foi: Tve > PC > PS > Tvi > Le. Respectivamente: 93,5% > 83,7% > 81,5% > 74,3% > 71,4%. Então, com uma biomassa maior, é maior. Menos tempo é requerido para remover a cor (Fig. 4). As espécies Tvi e Le logicamente requereram mais tempo para descolorir tanto quanto o PC e o PS.

Não somente a Lcc, mas também a MnP produzida pelo Tve contribuiu para a degradação do corante. Em um dia, descoloriu 36,9%. Em cinco dias, 61,6%. Em oito dias, 72,1%. Foi capaz de atingir mais que 90% durante nove dias. Então, demonstrou intensa descoloração (Fig. 4), enquanto a atividade da MnP cresceu continuamente. Entre o sexto e o décimo terceiro dias, cresceu de 0,01 para 0,03 Abs. (mL.min)⁻¹ (Fig. 5). Portanto, a descoloração foi acompanhada de produção enzimática. O Azul Indigotina foi um possível substrato para a MnP.

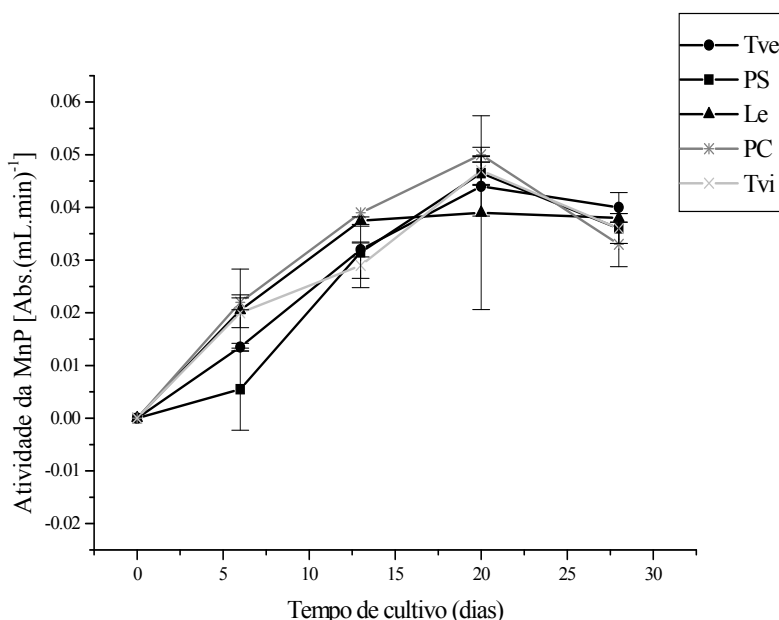


Figura 5: Atividades da manganês peroxidase [Abs.(mL.min)⁻¹] determinadas de todas as espécies repicadas (20 discos) em meio líquido com o corante Azul Indigotina solubilizado, monitoradas em 28 dias de cultivo.

Assim como quando presente o corante, a atividade da MnP proveniente do Tve demonstrou tendência de crescimento durante todo o tempo de cultivo quando ausente o composto. Até o sexto dia, neste tipo de meio líquido, foi maior (Fig. 6). Então, a enzima contribuiu mais para a oxidação do corante que para a das substâncias húmicas. Não somente estas substâncias induziram a produção. De acordo com a literatura, há uma outra substância capaz de induzir, o ácido oxálico. Este composto orgânico também poderia estar presente na água de poço. Age na degradação de lignina. Quela íons Mn³⁺ instáveis e fornece peróxido de hidrogênio. Pode reduzir o pH do meio extra celular também. Então, contribui para a performance das peroxidases, incluindo a MnP (9).

Enquanto o percentual de descoloração do PS aumentou, houve aumento de produção de MnP até o décimo terceiro dia – 0,03 Abs. (mL.min)⁻¹ (Fig. 5). A enzima, portanto, oxidou o Azul Indigotina até este dia. Durante todo o tempo de cultivo, a atividade foi maior quando ausente o corante (Fig. 6). Baseado nisso, a enzima possivelmente oxida em maiores quantidades as HS.

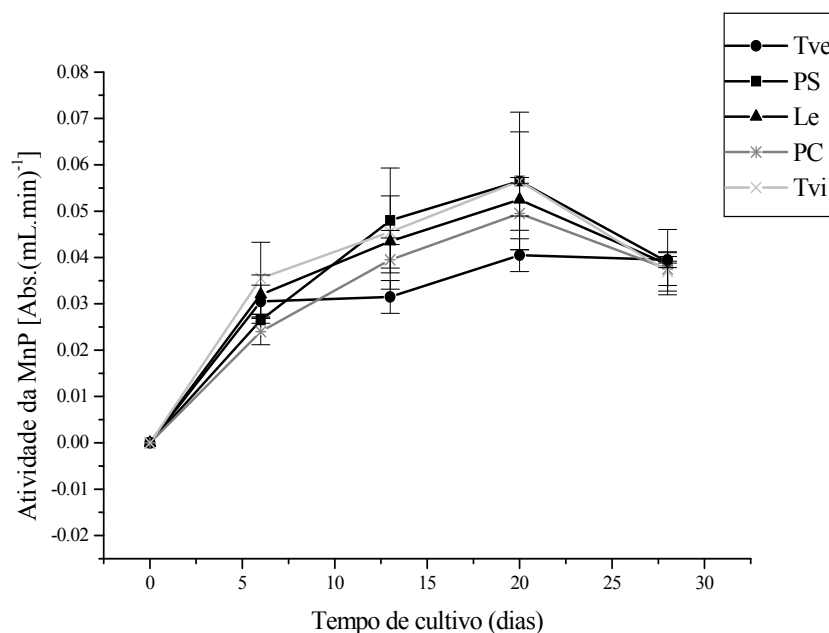


Figura 6: Atividades da manganês peroxidase [Abs.(mL.min)⁻¹] determinadas de todas as espécies repicadas (20 discos) em meio líquido sem o corante Azul Indigotina, monitoradas em 28 dias de cultivo.

Baseado nos percentuais de descoloração determinados até o nono dia, a espécie Le requereu mais tempo para remover a cor, assim como as espécies PS e PC (Fig. 45). Enquanto a atividade da MnP aumentou durante os doze primeiros dias, a remoção de cor foi gradual. Após este dia, a atividade manteve-se praticamente constante (Fig. 5). Portanto, o corante ainda era substrato no restante do tempo. No meio líquido sem o corante, durante praticamente todo o tempo de cultivo, a atividade da MnP permaneceu alta (Fig. 6). Para a espécie Le, portanto, as substâncias húmicas podem ter sido substrato para esta enzima.

Para a espécie PC, a descoloração continuou após o nono dia (Fig. 4). Ainda havia 16% da cor para remover. Até o vigésimo primeiro dia, a MnP foi produzida gradualmente (Fig. 5). A descoloração foi acompanhada de produção de MnP. Quando ausente o corante, a produção foi similar (Fig. 6). Portanto, não há como afirmar para qual oxidação, das HS ou do corante, a enzima contribuiu mais.

Para a espécie Tvi, também à produção de MnP seguiu-se descoloração (Fig. 5). A enzima possivelmente oxida o corante, visto que há aumento de atividade. Porém, quando ausente o corante, a atividade é maior, durante praticamente todo o tempo de cultivo (Fig. 6). Portanto, a enzima possivelmente degrada as HS em maiores quantidades.

CORANTE VERMELHO Nº 6 PONCEAUX 4R

1. PRIMEIRO EXPERIMENTO (BIOMASSA DE 20 DISCOS):

Comportamento comum entre as espécies referente às atividades da MnP: até o sexto dia, aumento; do sexto ao sétimo, queda; deste ao décimo primeiro, aumento; no tempo restante, mantiveram-se quase constantes; pico de produção no sexto dia.

Atividades da Lacase e Manganês Peroxidase provenientes do Tve: nos primeiros sete dias, a Lacase contribuiu para a oxidação do corante, visto que evidenciou-se aumento do percentual de cor – atingiu 39,2%, e tendência de crescimento da atividade. Mesma tendência observou-se para a MnP até o sexto dia de cultivo. Portanto, deve haver ação enzimática frente à degradação do corante. Após o sétimo dia, até o décimo primeiro, a atividade da Lcc manteve-se alta e a da MnP cresceu gradualmente. A partir do décimo primeiro dia, a atividade da MnP manteve-se constante. Outras possíveis substâncias que podem ter induzido a atividade enzimática são: as substâncias húmicas (ácidos húmicos) e o ácido oxálico. Este ácido facilita a

degradação de lignina, podendo interferir na performance das peroxidases, como a MnP. As substâncias húmicas podem ter interferido na atividade da Lacase durante os últimos dias de cultivo e na da MnP após o décimo primeiro dia (Fig. 7).

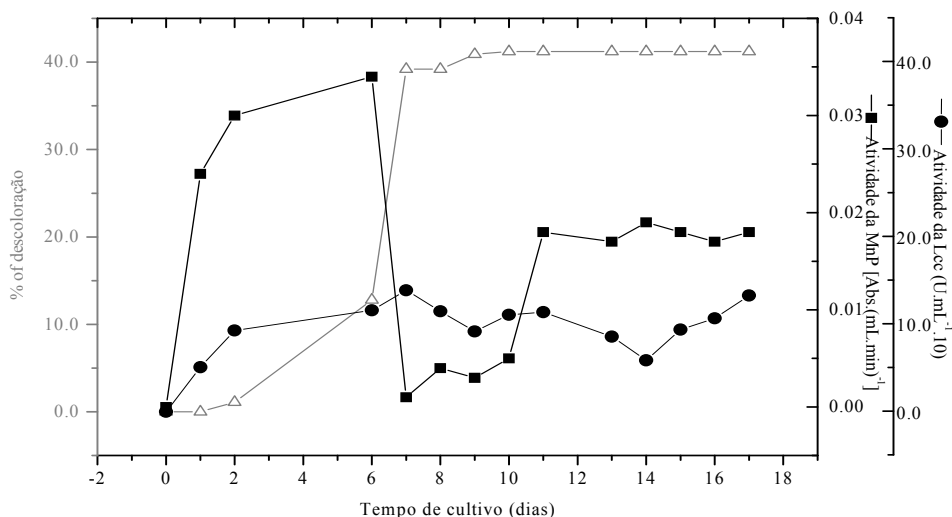


Figura 7: Atividades da Lcc ($\text{U.mL}^{-1}.10$) e MnP [$\text{Abs.}(\text{mL.min})^{-1}$] oriundas da espécie Tve, biomassa de 20 discos, correlacionadas à descoloração.

As atividades da Lacase e Manganês Peroxidase permaneceram praticamente constantes e foram acompanhadas de pequeno aumento da descoloração. A Lacase contribuiu mais. Entre o sexto e sétimo dias, a atividade da Lacase permaneceu alta – $6,9 \text{ U.mL}^{-1}.10$ – e a MnP ainda era produzida – $0,004 \text{ Abs.}(\text{mL.min})^{-1}$. Portanto, neste intervalo, ambas as enzimas contribuíram para a oxidação do corante. A partir do sétimo dia, o percentual de decoloração praticamente manteve-se constante. Portanto, até os últimos dias de cultivo, as substâncias húmicas podem ter induzido as enzimas. Outras possibilidades de substâncias indutoras: cinabarina, para a Lcc; ácido oxálico, para a MnP (Fig. 8).

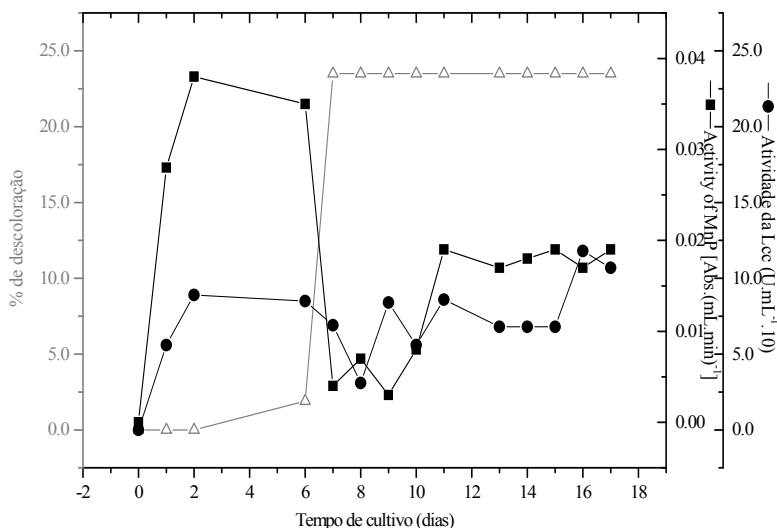


Figura 8: Atividades da Lcc ($\text{U.mL}^{-1}.10$) e MnP [$\text{Abs.}(\text{mL.min})^{-1}$] oriundas da espécie PS, biomassa de 20 discos, correlacionadas à descoloração.

Atividades da Lacase e Manganês Peroxidase provenientes do Le: antes do sexto dia e após o sétimo não houve ação das enzimas, porque não houve descoloração. Entre o sexto e sétimo dias, a Lcc contribuiu para a



degradação do corante. Somente neste período houve descoloração – 12,1% da cor removida. Após o período de descoloração, as atividades apresentaram tendência de crescimento, portanto, neste momento, foram induzidas pelas substâncias húmicas (Fig. 9).

Atividades da Lacase e Manganês Peroxidase provenientes do PC: como não houve descoloração significativa, ambas as enzimas não contribuíram muito para a oxidação do composto colorido. Entre o sexto e sétimo dias, a Lcc contribuiu para a degradação – a atividade atingiu $8,5 \text{ U.mL}^{-1}.10$. Entre o sétimo e décimo dias – a atividade da MnP demonstrou tendência de crescimento e a da Lcc, de queda. Em dez dias, o fungo removeu 2,5% da cor. Após o décimo primeiro dia, as outras substâncias já mencionadas podem ter induzido as atividades (Fig. 10).

Atividades da Lacase e Manganês Peroxidase provenientes do Tvi: nos primeiros dias de cultivo, assim como demonstrado para a espécie Le, não houve ação das enzimas. Entre o sexto e sétimo dias, a Lcc contribuiu para a oxidação do composto colorido – a atividade atingiu $11,3 \text{ U.mL}^{-1}.10$. Durante o restante do tempo de cultivo existe a possibilidade de indução das atividades de ambas as enzimas pelas outras substâncias – não houve descoloração (Fig. 11).

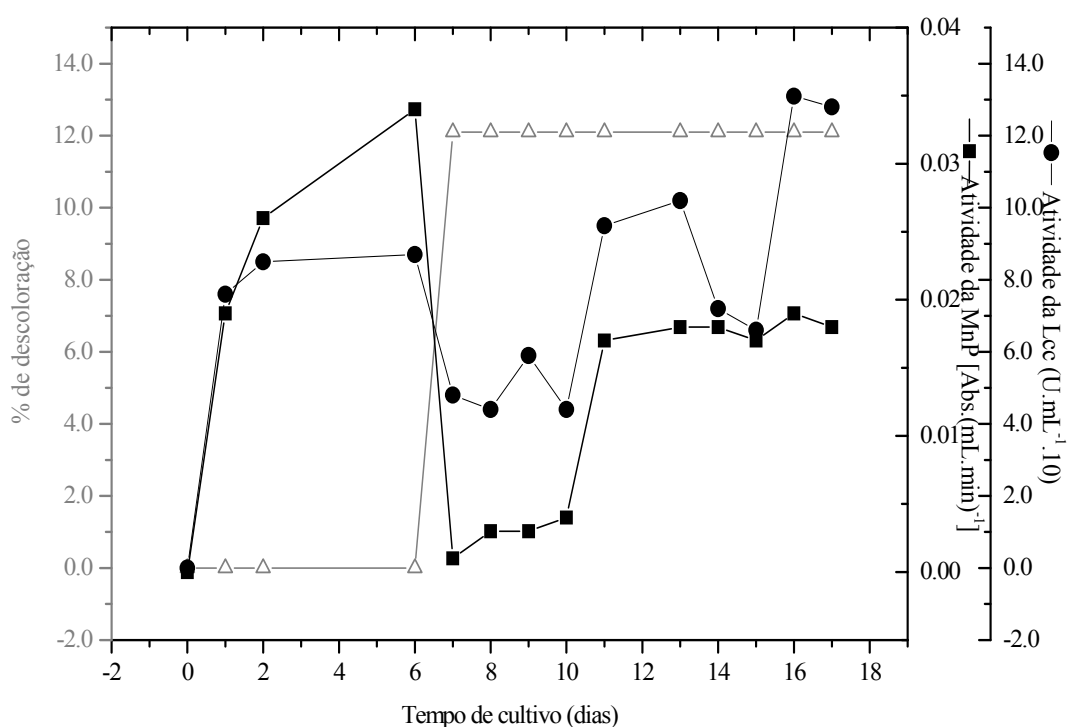


Figura 9: Atividades da Lcc ($\text{U.mL}^{-1}.10$) e MnP [$\text{Abs.}(\text{mL.min})^{-1}$] oriundas da espécie Le, biomassa de 20 discos, correlacionadas à descoloração.

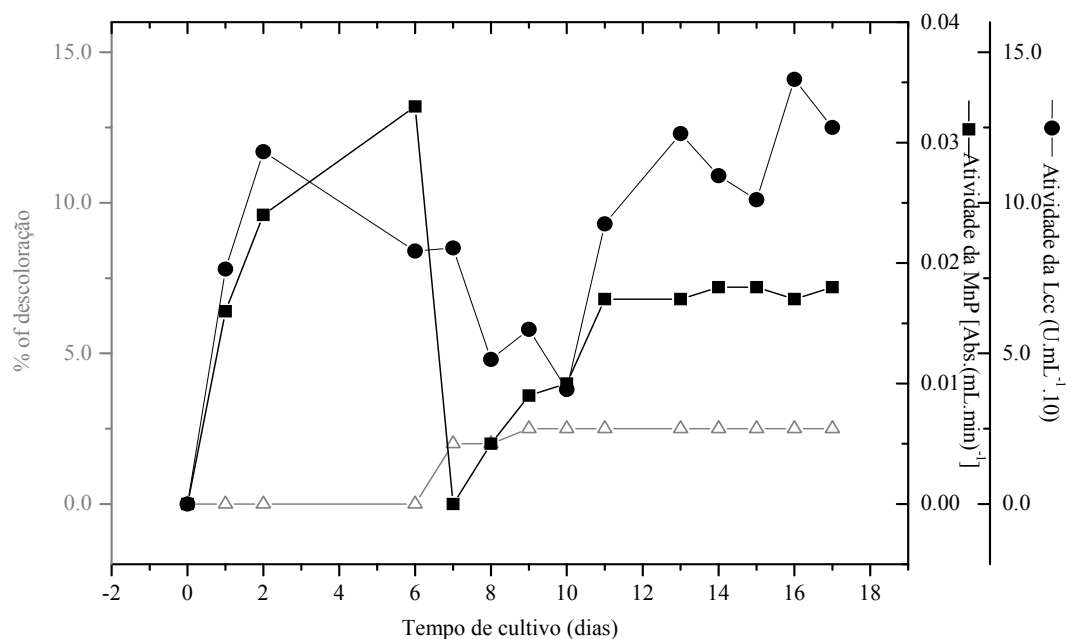


Figura 10: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e MnP [Abs.(mL.min)⁻¹] oriundas da espécie PC, biomassa de 20 discos, correlacionadas à decoloração.

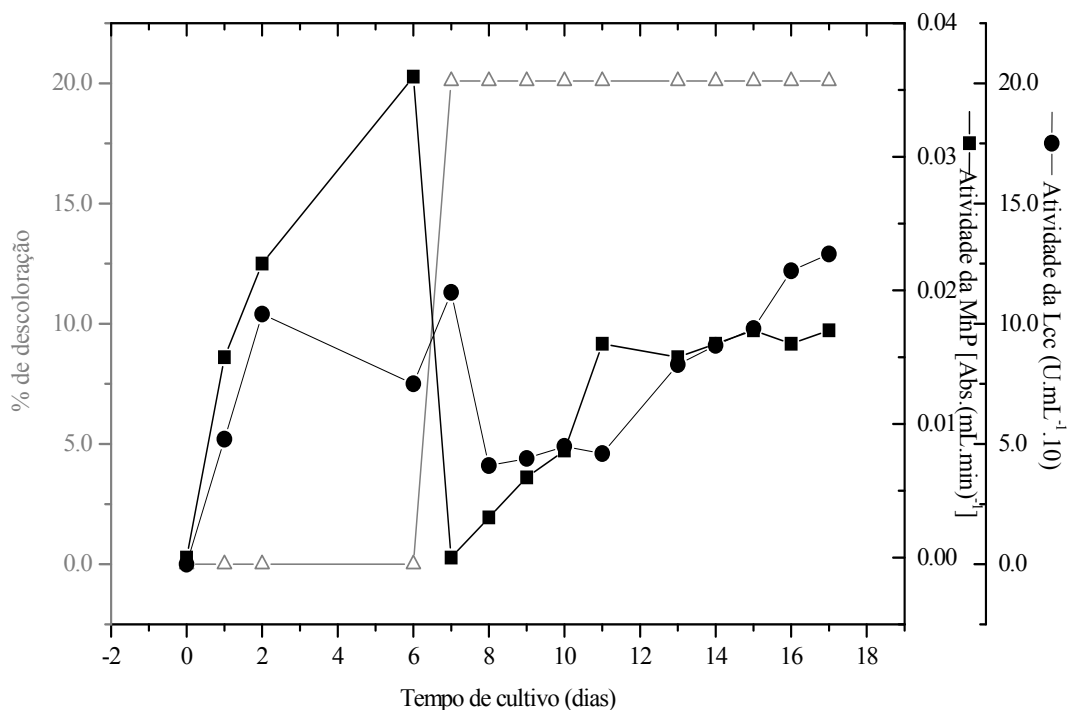


Figura 11: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e MnP [Abs.(mL.min)⁻¹] oriundas da espécie Tvi, biomassa de 20 discos, correlacionadas à decoloração.



2. SEGUNDO EXPERIMENTO (BIOMASSA DE 50 DISCOS):

Atividades da Lacase e Lignina Peroxidase provenientes do Tve: durante praticamente todo o tempo de cultivo houve ação enzimática. Exceção para o sétimo dia, em que a atividade da LiP foi nula. Durante todo o tempo, a atividade da Lcc cresceu continuamente. O pico de atividade da LiP foi no décimo dia – $0,59 \text{ U.mL}^{-1}$. Manteve-se próxima do pico durante o resto do tempo. No décimo dia, o fungo já havia removido 77,8% da cor. A atividade demonstrou tendência de crescimento anteriormente. Ambas as atividades foram acompanhadas de intensa descoloração, sendo a Lcc a que mais contribuiu para degradar o corante (Fig. 12).

Atividades da Lacase e Lignina Peroxidase provenientes do PS: em quatro dias, o fungo somente descoloriu 3,6%. Em dez, 11,6%. Durante o restante do tempo, o percentual praticamente manteve-se constante. Até o quarto dia, a atividade da Lcc aumentou. Atingiu o pico no décimo dia – $11,2 \text{ U.mL}^{-1}$. A atividade da LiP apresentou comportamento similar, porém pico de produção no quarto dia – $1,13 \text{ U.mL}^{-1}$. Ambas as atividades foram acompanhadas de gradual descoloração. Portanto, possivelmente ambas contribuíram para oxidar o corante (Fig. 13).

Atividades da Lacase e Lignina Peroxidase provenientes do Le: a contribuição das enzimas para oxidar o composto colorido foi muito pequena, porque o fungo somente removeu 3% da cor. Em quatro dias, acompanhadas de uma descoloração de 0,1%, as atividades das enzimas Lcc e LiP foram, respectivamente, $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,67 \text{ U.mL}^{-1}$. Até o vigésimo primeiro dia, enquanto o fungo descoloriu, houve aumento de produção de ambas as enzimas (Fig. 14).

Atividades da Lacase e Lignina Peroxidase provenientes do PC: a Lcc contribuiu mais para a oxidação do Vermelho Ponceaux até o décimo dia de cultivo. Diferentemente da Lcc, a LiP demonstrou tendência de aumento de produção durante todo o tempo. Até o vigésimo primeiro dia, as atividades foram acompanhadas de significativa remoção de cor – o percentual atingiu 35%. Entre o décimo quarto e vigésimo primeiro dias, já que o fungo produziu mais LiP, esta foi a enzima que mais contribuiu. Portanto, há ação enzimática, mas não se pode afirmar qual enzima contribuiu mais durante todo o tempo de cultivo (Fig. 15).

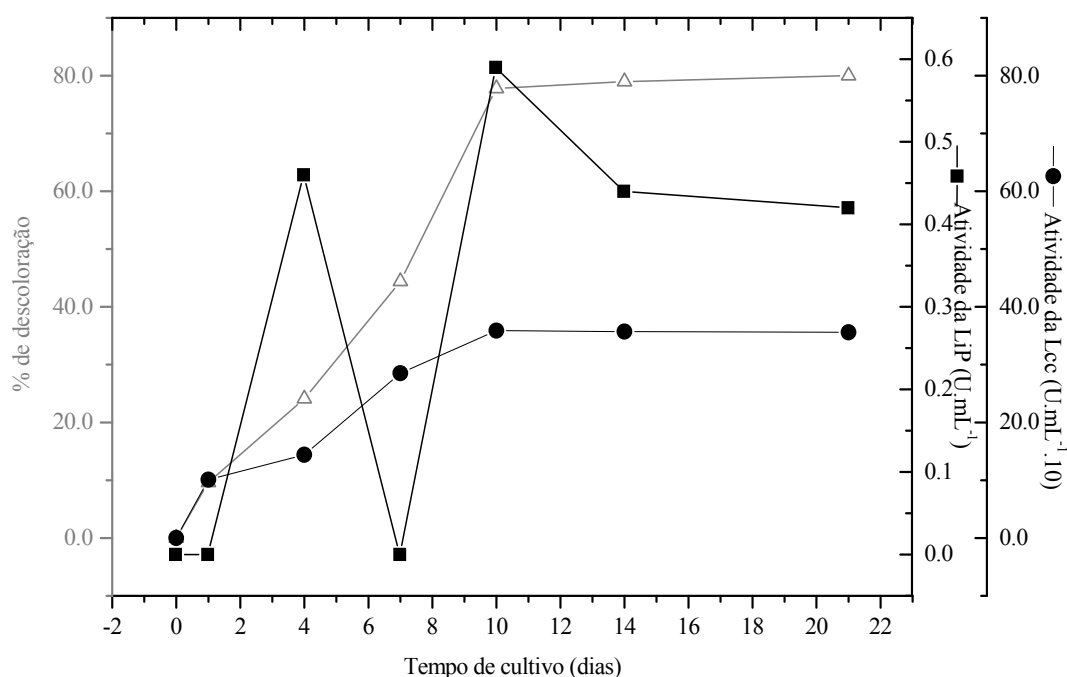


Figura 12: Atividades da Lcc ($\text{U.mL}^{-1} \cdot 10$) e LiP (U.mL^{-1}) oriundas da espécie Tve, biomassa de 50 discos, correlacionadas à descoloração.

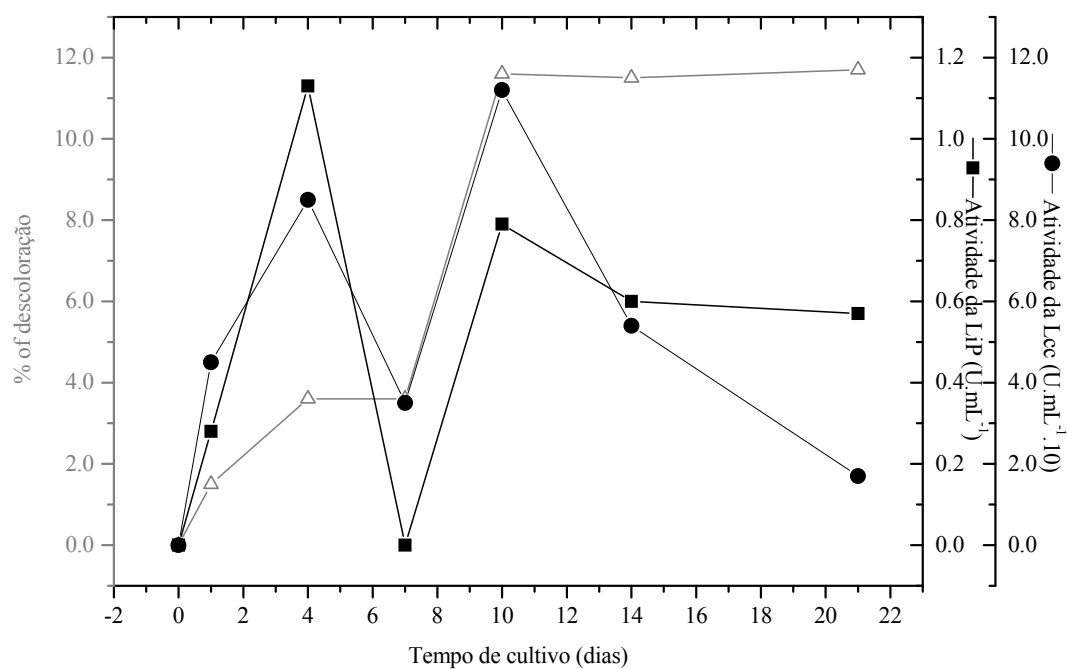


Figura 13: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e LiP (U.mL⁻¹) oriundas da espécie PS, biomassa de 50 discos, correlacionadas à descoloração.

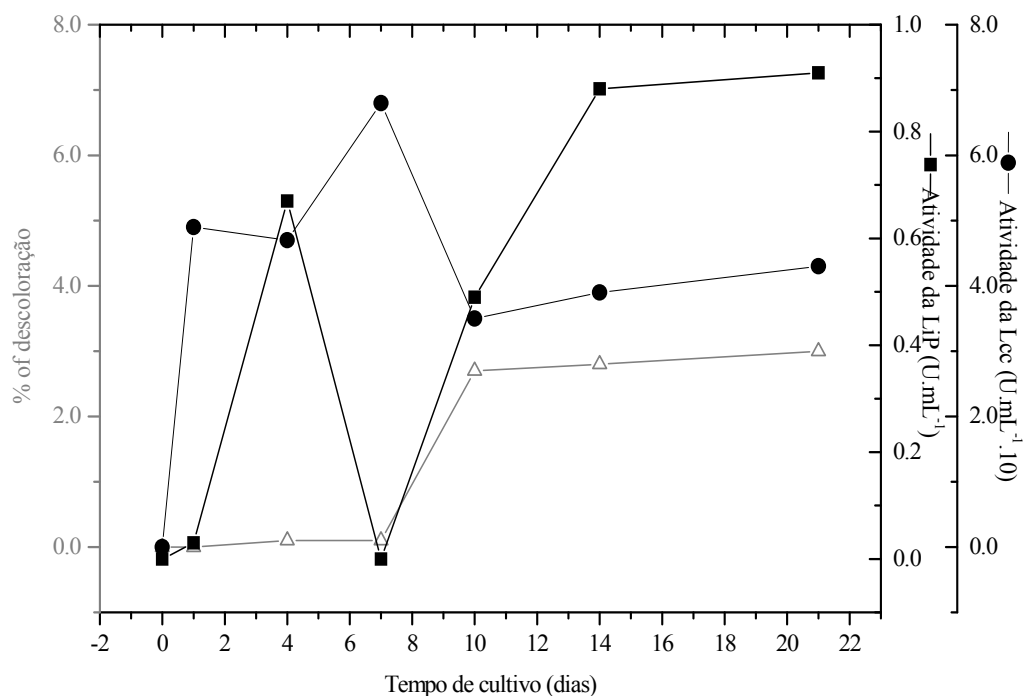


Figura 14: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e LiP (U.mL⁻¹) oriundas da espécie Le, biomassa de 50 discos, correlacionadas à descoloração.

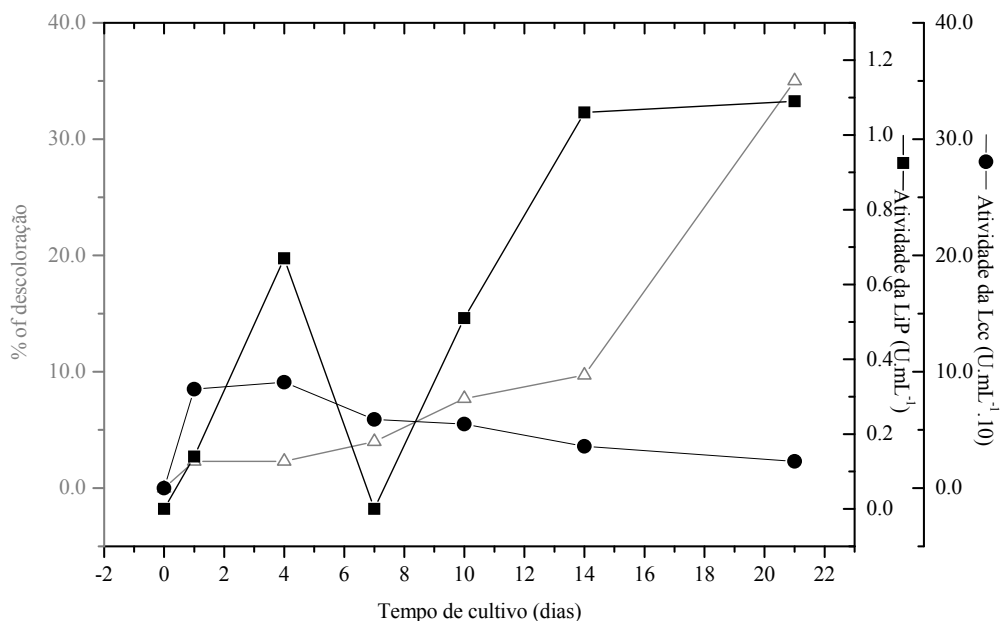


Figura 15: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e LiP (U.mL⁻¹) oriundas da espécie PC, biomassa de 50 discos, correlacionadas à descoloração.

Atividades da Lacase e Lignina Peroxidase provenientes do Tvi: ambas as atividades apresentaram comportamento semelhante ao demonstrado para a espécie PC. Exceção para o fato de a atividade da Lcc demonstrar início de queda a partir do primeiro dia de cultivo. Foram acompanhadas por significativa remoção de cor ao longo do tempo – o percentual atingiu 61,8% em vinte e um dias. A LiP foi a melhor contribuinte para a degradação do composto colorido nos intervalos: durante o quarto dia, entre o décimo e o vigésimo primeiro (Fig. 16).

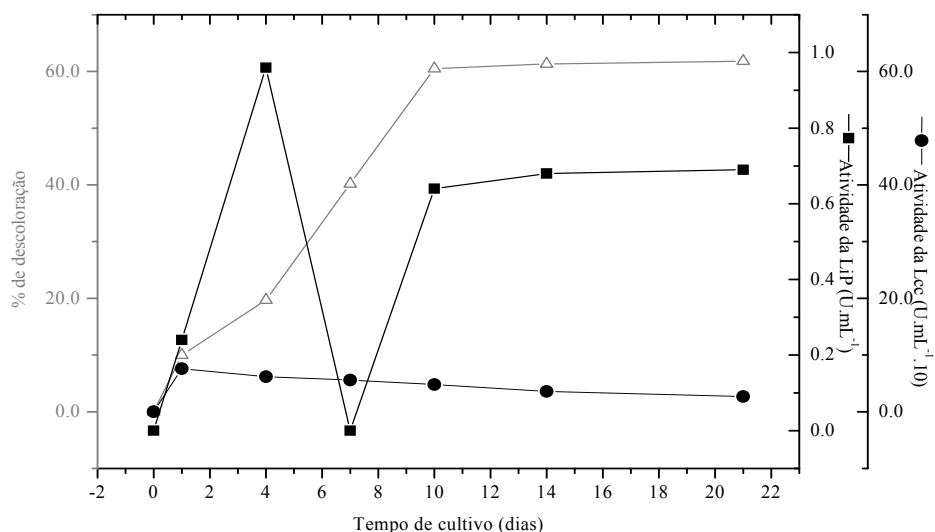


Figura 16: Atividades da Lcc (U.mL⁻¹.10) e LiP (U.mL⁻¹) oriundas da espécie Tvi, biomassa de 50 discos, correlacionadas à descoloração.

3. COMPARAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO (%) ENTRE AS DIFERENTES BIOMASSAS:

Em condições estáticas, as atividades das peroxidases não são inibidas (14). Justifica-se, pois, que a atividade da LiP demonstre tendência de aumento após o sétimo dia, oriunda das espécies Le, PC e Tvi. A espécie Tvi, uma vez que é bastante eficaz para remover a cor, pode ser aplicada para a degradação de corantes azo. Por exemplo, a Lcc proveniente deste fungo pode converter tais compostos a fenólicos (9).

Com uma biomassa de 20 discos, a ordem decrescente de descoloração em dezessete dias foi: Tve > PS > Tvi > Le > PC. Respectivamente: 41,2% > 23,5% > 20,1% > 12,1% > 2,53% (Fig. 17).

Com uma biomassa de 50 discos, a ordem decrescente de descoloração em vinte e dois dias foi: Tve > Tvi > PC > PS > Le. Respectivamente: 83,2% > 68,8% > 46,4% > 11,7% > 3,0% (Fig. 18).

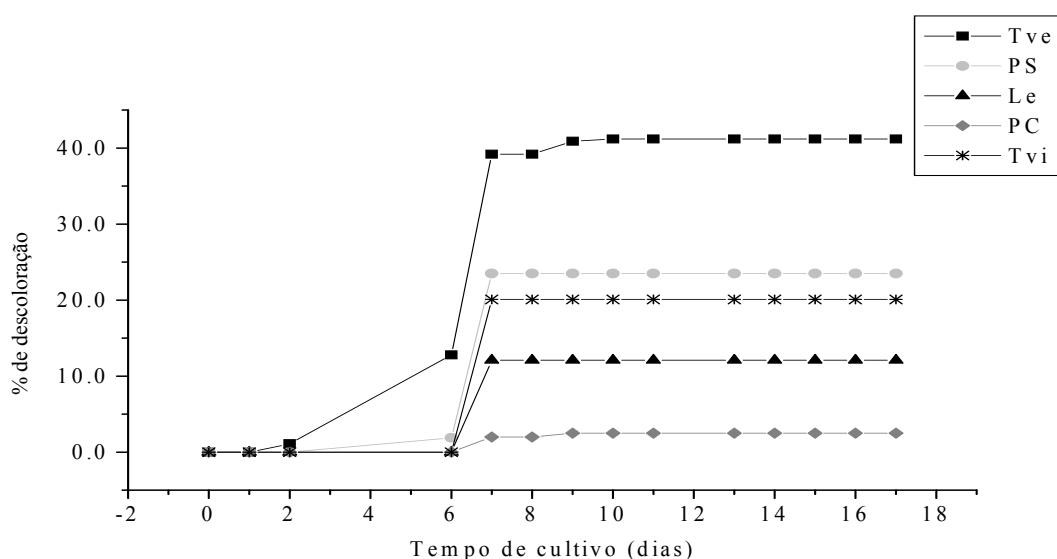


Figura 17: Comparação entre os percentuais de descoloração das cinco espécies (primeiro experimento).

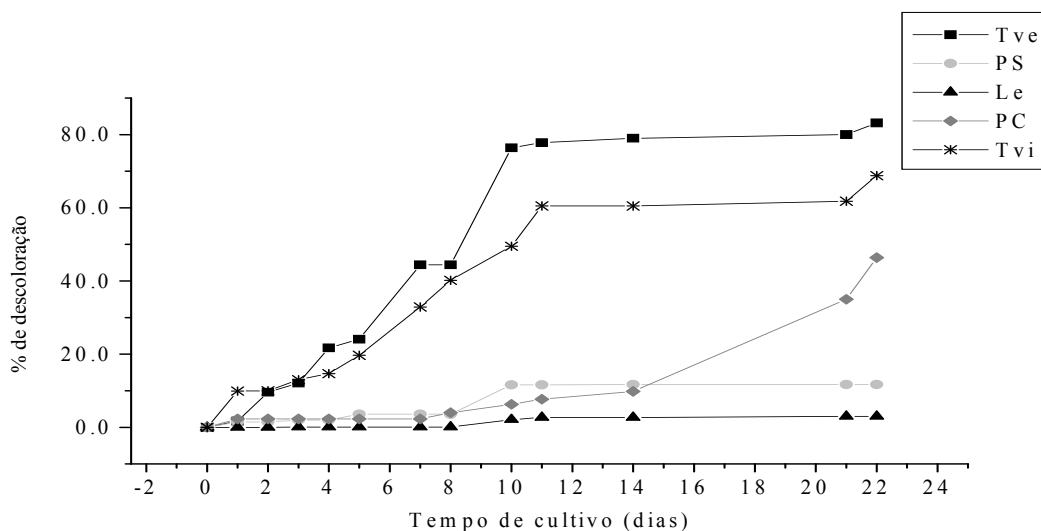


Figura 18: Comparação entre os percentuais de descoloração das cinco espécies (segundo experimento).



A descoloração é maior com uma biomassa maior. Esta hipótese é baseada no fato de que a maioria das espécies, Tve, PC e Tvi, apresentaram tal comportamento.

O experimento com 50 discos apresentou altos percentuais de remoção de cor que foram atingidos em menor tempo. Considerando, por exemplo, o comportamento durante quatro dias de cultivo das espécies Tve e Tvi, que descoloriram mais. Com 20 discos, em dois dias, o Tve atingiu 1,1%. Em quatro dias, entre 5% e 10% (Fig. 17). Com 50 discos, em dois dias, 9,6%. Em quatro, 21,7% (Fig. 18). Com uma biomassa menor, atingiu mais que 10% da cor removida em seis dias. O Tvi, com 20 discos, em dois dias, não apresentou descoloração. Com 50 discos, atingiu 10%. Com uma biomassa menor, em quatro dias, ainda não houve descoloração. Com uma maior, 14,7%.

Somente para a espécie Tve é sugerida uma possível influência, em termos proporcionais, da biomassa em ambos os parâmetros analisados: descoloração e produção enzimática. Com uma maior biomassa, o fungo produziu mais lacase e descoloriu mais.

O fungo Le, com 50 discos, provavelmente, foi menos eficiente porque a Lcc foi produzida em menor quantidade.

Para os fungos PC e Tvi, mesmo com uma biomassa maior, houve menor produção da enzima Lcc. Portanto, em termos proporcionais, a influência da biomassa, neste caso, não pode ser sugerida.

CONCLUSÕES

Em meio líquido com o corante Azul Indigotina solubilizado, com o cultivo de uma biomassa maior, o corante é mais facilmente degradado. A espécie *Trametes versicolor* foi selecionada como a melhor espécie, visto que removeu 93,5% da cor em nove dias. Quando a biomassa é menor o corante demonstra maior resistência para ser degradado, os percentuais não ultrapassaram o valor de 45% em vinte e cinco dias.

As espécies *Pycnoporus sanguineus* e *Phanerochaete chrysosporium* também se destacaram em termos de descoloração, pois foram capazes de remover mais que 80% da cor durante os nove dias. Para todas as espécies, há ação enzimática referente à degradação do corante.

Em meio líquido com o corante Vermelho Nº 6 Ponceaux 4R solubilizado, novamente pode ser estabelecida uma relação diretamente proporcional entre a descoloração e a quantidade de biomassa: com uma biomassa maior, a descoloração é maior para a maioria das espécies – Tve, PC e Tvi. As espécies Tve e Tvi foram capazes de descolorir maiores quantidades em menos tempo, mesmo em condições estáticas. Portanto, as espécies de gênero *Trametes* apresentam boas perspectivas a serem aplicadas em tratamento biológico com o objetivo de reduzir o impacto ambiental gerado pelas águas residuárias. Aparentemente todas as espécies fizeram uso do sistema ligninolítico para degradar o corante vermelho. Pode-se verificar ainda que há ação das enzimas Lcc e MnP no primeiro experimento e da Lcc e LiP, no segundo.

A espécie *Trametes versicolor* foi a mais eficiente na degradação dos corantes constituindo, neste experimento, a melhor espécie a ser aplicada em processos biológicos e sistemas de filtração lenta. Principalmente em relação à produção de lacase.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANTE, V.; MILAGRES, A. M. F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} -reducing activity from white rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme Microb. Technol.*, n.42: 17-22, 2007.
2. ARORA, D. S.; CHANDER, M. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments*, n. 72: 192-198, 2007.
3. BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, n.50: 245-253, 2004.
4. BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*, n.94: 107-112, 2004.
5. GARCIA, T. A. Produção e caracterização de duas lacases do Fungo *Pycnoporus sanguineus*. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2006.
6. HUISMAN, L.; WOOD, W. E. Slow sand filtration. World Health Organization, Geneva, 1974.
7. LOPES, M. M. G. Remoção do corante FD&C azul nº 2 Indigotina em água com uso de fungos de decomposição branca e processo de filtração lenta: avaliação em escala piloto. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente PPGEMA, Goiânia, 2008.
8. LUNDELL T.; MÄKELÄ, M.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, n.30: 542-549, 2002.
9. MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. *Brazilian Journal Microbiology*, n.37: 481-487, 2006.
10. PAULO, A. C.; ZILLE, A.; GÓRNACKA, B.; REHOREK, A. Degradation of Azo dyes by *Trametes villosa* Laccase over Long Periods of Oxidative Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, n.11: 6711-6712, 2005.
11. RYAN D.; LEUKES, W.; BURTON, S. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, n. 98: 579-587, 2007.
12. SALES. Estudo da tratabilidade fúngica e fotocatalítico de efluente de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia, GO. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.
13. TANGERINO, E. P.; DI BERNARDO, L. Remoção de substâncias húmicas por meio da oxidação com ozônio e peróxido de hidrogênio e FiME. *Engenharia sanitária ambiental*, v.10, n.4: 290-298, 2005.
14. WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.*, n.22: 161-167, 2003.