



# **Degradação de Corantes Têxteis por Fungos Filamentosos Isolados do Planalto das Agulhas Negras – RJ**

**Eduardo Lascasas Ferreira Morfim dos Santos**

## **Projeto de Final de Curso**

**Orientadores**

**Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc.**

**Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.**

**Agosto de 2018**

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO PLANALTO DAS AGULHAS  
NEGRAS – RJ**

*Eduardo Lascasas Ferreira Morfim dos Santos*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

---

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

---

Andrew Macrae, D.Sc.

---

Alana Pereira de Almeida, M.Sc.

Orientado por:

---

Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc.

---

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil  
Agosto de 2018

## **Ficha Catalográfica**

Santos, Eduardo Lascasas Ferreira Morfim dos

Degradação de Corantes Têxteis por Fungos Filamentosos Isolados do Planalto das Agulhas Negras – RJ / Eduardo Lascasas Ferreira Morfim dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2018  
x, 97 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento

1. Biorremediação. 2. Corantes têxteis. 3. Fungos filamentosos. 4. Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Rodrigo Pires do Nascimento. I.Degradação de Corantes Têxteis por Fungos Filamentosos Isolados do Planalto das Agulhas Negras – RJ

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente a todos os meus amigos que me auxiliaram de alguma forma a me superar e persistir mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha família, que esteve comigo em todos os momentos e que sempre teve confiança de que eu conseguiria chegar ao fim.

Gostaria de agradecer ao professor Rodrigo Pires do Nascimento por ter me recebido como um aluno de iniciação científica voluntária e posteriormente pelo seu trabalho como professor orientador que foi de grande auxílio na elaboração deste projeto.

Agradeço ainda aos professores Bernardo Dias Ribeiro e Maria Alice Zarur Coelho por me permitir usufruir das dependências do Laboratório BIOSE (E-103) e utilizar alguns equipamentos para o desenvolvimento dos experimentos relatados aqui no projeto.

Agradecimento especial à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Também gostaria de agradecer a todos os colegas do laboratório (LEPM), especialmente à Julia Ramos, João Sabback, Lucas Cardoso e Alana Pereira que me auxiliaram durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Finalmente, gostaria de fazer um agradecimento especial à Frederico Loeffler, Thais de Souza e Bernardo de Sá Rollemberg que me ajudaram significativamente neste percurso.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

## **Degradação de corantes da indústria têxtil por fungos filamentosos isolados do Parque Nacional de Itatiaia**

Eduardo Lascasas Ferreira Morfim dos Santos

Agosto, 2018

Orientador: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc, Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

O Parque Nacional de Itatiaia representa um ecossistema peculiar dentro do bioma Mata Atlântica com 2 áreas de vegetação. Até o presente momento, existem poucos estudos voltados para a diversidade microbiana e seu potencial biotecnológico no que concerne ao Planalto das Agulhas Negras. A partir de amostras de solo e serrapilheira coletados acima de 2.400 m de altitude, foram isolados 69 fungos de 8 amostras ambientais e o potencial em degradar corantes têxteis foi avaliado. Os corantes Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR), Reactive Black 5 (RB-5) e Rosa Bengala foram testados nas concentrações de 100 e 200 ppm, em meio Agar Malte (pH 5.5) e a presença de zonas de degradação / adsorção foi observada ao fim de 7 e 14 dias a 28°C. Após esse período, 5 fungos foram promissores na degradação do corante RBBR, 10 na degradação do corante Rosa Bengala e 2 no RB-5. A partir dos resultados observados em placas de Petri, 2 linhagens, I10-8 e I13-7, foram selecionadas para fermentação em sistema submerso de modo a avaliar o percentual de descoloração do corante testado. As linhagens foram identificadas como *Penicillium* sp. I13-7 e *Trichoderma* sp. I10-8. Na fermentação em sistema submerso foram testados os corantes RB-5, Reactive Red 120 (RR-120) e Direct Yellow 27 (DY-27) – de modo a testar se ocorreria a degradação de um outro corante do tipo reativo e corantes do tipo direto. Para isto, inicialmente foi utilizado um espectrofotômetro de varredura na faixa de 200-1000nm para a observação dos diferentes comprimentos de onda dos corantes antes e após a fermentação. Contudo, foi possível observar um escurecimento nos meios de cultivo contendo os 3 corantes testados durante a fermentação em sistema submerso e uma nova abordagem foi adotada para determinar as possíveis causas do escurecimento nos 3 corantes, após fermentação com as duas linhagens fúngicas testadas. A nova abordagem utilizaria as enzimas extracelulares produzidas pela linhagem após a fermentação submersa por 14 dias na avaliação do percentual de corante degradado. A linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 apresentou escurecimento no meio de seleção em placa de Petri, enquanto que *Penicillium* sp. linhagem I13-7 promoveu 100% de descoloração do corante RB-5. Baseado nessa observação prévia, a linhagem *Penicillium* sp. I13-7 foi cultivada, por sistema submerso, em meio de malte sem suplementação dos 3 corantes testados, não sendo observado nenhum escurecimento do meio após 14 dias de fermentação a 28°C / 180 rpm. O fungo I13-7 *Penicillium* sp. foi selecionado como a mais promissora linhagem trabalhada, com uma descoloração de 100% do corante RB-5 ao fim de 7 dias de fermentação submersa e com degradação de 76.7% do corante após 14 dias de fermentação através da técnica do meio fermentado.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
II.1 Prospecção da indústria têxtil .....	4
II.1.2 Mercado Global.....	4
II.1.2 Mercado Brasileiro.....	6
II.2 Processo de Tingimento.....	9
II.2.1 Fixação do Corante.....	11
II.3 Tipos de Corantes .....	12
II.3.1 Corantes Reativos.....	13
II.3.2 Corantes Diretos.....	15
II.3.3 Corantes Azóicos.....	16
II.3.6 Corantes Xantenos.....	17
II.4 Rejeitos Industriais .....	17
II.4.2 Tratamento de Efluentes.....	20
II.5 Uso de Micro-organismos na Biotecnologia .....	22
II.5.1 Fungos Filamentosos.....	23
<b>CAPÍTULO III – JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO IV – OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
IV.1 Objetivo Geral.....	29
IV.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>CAPÍTULO V – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
V.1 Coleta das Amostras.....	30
V.2 Isolamento dos Micro-organismos .....	31
V.3 Identificação dos Fungos em Nível de Gênero .....	31
V.4 Avaliação Qualitativa da Descoloração dos Corantes em Meio Sólido.....	31
V.5 Fermentação Submersa.....	32
V.6 Espectro dos Corantes e Relação de Lambert-Beer .....	33
V.7 Degradação do Corante por Meio Fermentado .....	33
<b>CAPÍTULO VI – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>35</b>
VI.1 Isolamento dos Micro-organismos.....	35
VI.2 <i>Screening</i> para Degradação de Corantes em Meio Sólido.....	36

VI.3 Espectro dos Corantes e Lei de Lamber-Beer.....	43
VI.4 Fermentação Submersa da linhagem <i>Trichoderma</i> sp. I10-8 .....	49
VI.4.1 RB-5.....	49
VI.4.2 RR-120.....	50
VI.4.3 DY-27 .....	54
VI.4.4 Discussão .....	55
VI.5 Fermentação Submersa da Linhagem <i>Penicillium</i> sp. I-13-7 .....	55
VI.5.1 RB-5.....	56
VI.5.2 RR-120.....	59
VI.5.3 DY-27 .....	63
VI.5.4 Discussão .....	64
VI.3.3 Discussões Gerais sobre as Fermentações submersas e Motivos para a Nova Abordagem .....	65
VI.4 Análise Através do Meio Fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 .....	66
VI.4.1 RB-5.....	66
VI.4.2 RR-120.....	71
VI.4.3 DY-27 .....	75
VI.4.4 Discussões Sobre a Nova Abordagem .....	78
<b>CAPÍTULO VII – PROPOSTA DE UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL .....</b>	<b>80</b>
VII.1 Legislação Ambiental .....	80
VII.2 Tratamento terciário proposto.....	82
<b>CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II-1: 10 maiores exportadores têxteis no mundo em 2016. ....	5
Figura II-2: 10 maiores importadores de produtos têxteis no mundo em 2016.....	6
Figura II-3: Balança comercial do setor têxtil de Janeiro a Maio de 2016 x 2017. ....	7
Figura II-4: Distribuição da indústria têxtil no país. Em destaque encontram-se as regiões mais relevantes (ALMEIDA, 2017). ....	9
Figura II-5: Estrutura química dos principais grupos presentes em fibras têxteis (GUARATINI et al., 1999). ....	10
Figura II-6: Exemplo da interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã (Fonte: GUARATINI et al., 1999). ....	11
Figura II-7: Exemplo da interação de hidrogênio entre o corante sulfonado e os grupos carboxilas da fibra de lã (Fonte: Guaratini et al., 1999). ....	12
Figura II-8: Exemplo da interação covalente entre um corante contendo grupos reativos (triazina) e grupos hidroxila presentes na celulose da fibra de algodão. (Fonte: GUARATINI et al., 1999). ....	12
Figura II-9: Exemplo do processo de tintura de algodão com corante contendo o grupo sulfatoetilsufona como centro reativo da molécula (Retirado de GUARATINI et al., 1999). ....	13
Figura II-10: Exemplo de algumas estruturas químicas de corantes, indicando seus respectivos grupos cromóforos (Azul) e ligantes entre a fibra e o corante (Vermelho). (DAMAZIO & MAGDALENA, 2016). ....	15
Figura II-11: Exemplo de composto azóico, 4-hidroxifenilazobenzeno (Sigma-Aldrich, 2018). ....	16
Figura II-12: Mapa do uso de água em etapas características do Processamento de Tecidos. (Fonte: BRAILE & CAVALCANTI, 1993). ....	18
Figura II-13: Rio Jianhe, China, após poluição industrial. (Fonte Reuters). ....	20
Figura V-1: Fluxograma da nova abordagem, meio fermentado. ....	34
Figura VI-1: Degradação das linhagens I13-10 e I13-5 para o corante Rosa Bengala em 100ppm. ....	40



Figura VI-2: Fotos da degradação em estado sólido do corante Rosa Bengala em 200ppm para algumas linhagens. ....	40
Figura VI-3:Fotos dos melhores fungos na fermentação em estado sólido para cada um dos corantes testados. ....	42
Figura VI-4:Espectro de absorbância do meio de cultura sem corante (branco). ....	43
Figura VI-5:Espectro de absorbância do corante RB-5 no meio de cultura. ....	44
Figura VI-6: Lei de Lambert-Beer para o corante RB-5 em 534nm (válida de 5 a 100ppm). ....	45
Figura VI-7:Espectro de absorbância do corante RR-120 no meio de cultura. ....	46
Figura VI-8: Lei de Lambert-Beer para o corante RR-120 em 518nm (válida de 3 a 200ppm). .	47
Figura VI-9:Espectro de absorbância do corante DY-27 no meio de cultura. ....	48
Figura VI-10:Lei de Lambert-Beer para o corante DY-27 em 400nm (válida de 3 a 200ppm). ..	48
Figura VI-11:Fermentação submersa pela linhagem <i>Trichoderma</i> sp. linhagem I10-8 do corante RB-5 com a retirada do branco. ....	49
Figura VI-12:Fermentação submersa pela linhagem <i>Trichoderma</i> sp. linhagem I10-8 do corante RR-120 com a retirada do branco .....	50
Figura VI-13:Redução da absorbância em 518nm para o corante RR-120 após fermentação submersa pela linhagem <i>Trichoderma</i> sp. I10-8. ....	51
Figura VI-14:Proposta de degradação do corante RR-120 utilizando cristais de ZnO. (VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011).....	53
Figura VI-15: Fermentação submersa pela linhagem <i>Trichoderma</i> sp. linhagem I10-8 do corante DY-27 com a retirada do branco.....	54
Figura VI-16:Fermentação submersa pela linhagem <i>Trichoderma</i> sp. linhagem I13-7 do corante RB-5 com a retirada do branco. ....	56
Figura VI-17: Redução da absorbância em 534nm para o corante RB-5 após fermentação submersa pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7. ....	57
Figura VI-18: Rota proposta para a degradação do corante RB-5 (ALAN et al., 2014). ....	59
Figura VI-19:Fermentação submersa do corante RR-120 pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7	

com a retirada do branco.....	60
Figura VI-20: Espectro de luz visível, (ATKINS & JONES, 2012) e sensibilidade do olho humano à luz visível (NDT, 2014). .....	61
Figura VI-21:Redução da absorbância em 518nm para o corante RR-120 após 7 dias de fermentação pelo <i>Penicillium</i> sp. I13-7 . .....	61
Figura VI-22:Fermentação submersa do corante DY-27 pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 com a retirada do branco.....	63
Figura VI-23: Réplicas da fermentação em submerso do DY-27 após 14 dias de fermentação pelo <i>Penicillium</i> sp. I13-7.....	64
Figura VI-24:Espectro do meio fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 após a adição de corante RB-5 na concentração de 200ppm. ....	67
Figura VI-25:Comparação dos dados obtidos na Fermentação submersa com o Espectro do Meio Fermentado para a linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7. ....	68
Figura VI-26: Melhor degradação do Corante RB5, ocorrida na fermentação submersa da linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 após 7 dias. ....	70
Figura VI-27: Percentual do corante RB-5 oxidado. O percentual em 14 dias de fermentação submersa foi afetado pela produção de um intermediário. ....	70
Figura VI-28:Espectro do meio fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 após a adição de corante RR-120 na concentração de 200ppm. ....	71
Figura VI-29:Comparação dos dados obtidos na fermentação submersa com o meio fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7. ....	72
Figura VI-30:Absorbância em 376nm para o corante RR-120 no meio de cultura (válido de 3 a 200ppm). ....	73
Figura VI-31: Melhor degradação do Corante RR-120, ocorrida no experimento do meio fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 após 14 dias. ....	74
Figura VI-32:Oxidação do corante RR-120 em ppm – percentualmente. O percentual em 14 dias de fermentação submersa foi afetado pela produção de um intermediário.....	75
Figura VI-33:Espectro do meio fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7 após a adição de corante DY-27 na concentração de 200ppm.....	76

Figura VI-34: Comparação dos dados obtidos na Fermentação submersa com o Espectro do Meio Fermentado pela linhagem <i>Penicillium</i> sp. I13-7. ....	77
Figura VII-1: Esquema da produção industrial de enzimas à partir de microorganismos (Adaptado de Headon & Walsh, 1994).....	83
Figura VII-2: Sistema de produção e purificação das enzimas.....	85
Figura VII-3: Imobilização de enzimas em MPS ( GUSTAFSSON, 2013).....	86
Figura VII-4: Leito fixo contendo MPS com as enzimas imobilizadas.....	86
Figura VII-5: Tratamento de efluente em indústrias têxteis (Federação das indústrias do estado de Minas Gerais, 2014).....	87
Figura VII-6: Proposta de tratamento de efluentes para a indústria têxtil. ....	88

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Um dos maiores e mais tradicionais setores industriais do mundo, a indústria têxtil encontra-se também entre as maiores poluidoras. Isto devido à quantidade de insumos utilizados que possuem uma baixa fixação e que associados com os elevados volumes de água utilizados acabam por gerar um grande volume de efluentes industriais, que caso não sejam tratados, são uma significativa fonte de poluição ambiental.

A indústria têxtil é um dos principais agentes poluidores mundiais no que concerne efluentes líquidos, destacando-se a poluição gerada nos países asiáticos e africanos, já que estes contam com legislações ambientais pouco eficientes, devido à ausência de fiscalização o que associado aos maiores polos industriais de produção têxtil gera um significativo volume de efluentes têxteis diariamente (TORRES, 2011).

Os corantes são desenvolvidos quimicamente para possuírem características como resistência à água e incidência de luz UV. Em especial, os corantes sintéticos são de difícil degradação em ambiente natural, apresentando estruturas muito complexas e elevada toxicidade, mesmo que presentes em baixas quantidades nos efluentes industriais. Embora a fixação dos corantes às fibras tenha sido otimizada quimicamente ao longo dos anos, a fixação dos corantes têxteis não é completa, sendo geradas quantidades significativas destas substâncias nos efluentes industriais.

Usualmente, em relação à remoção de corantes, técnicas de tratamento de resíduos têxteis acarretam apenas a transferência dos compostos da fase líquida do efluente para uma fase sólida, posteriormente alocada ou incinerada. O desenvolvimento de tecnologias que permitissem a destruição definitiva destes agentes corantes dos efluentes têxteis resultaria em um grande avanço para o setor. Assim, o emprego de técnicas de tratamento biológico ganhou destaque entre os pesquisadores atuais, visto seu potencial como tratamento de remoção dos compostos recalcitrantes através da adsorção, bioacumulação e biodegradação. Os fungos são agentes microbianos muito cotados, dado características como sua ampla carga de enzimas extracelulares, alta capacidade de adaptação e fácil manuseio para fins tecnológicos.

Desta forma, o presente projeto buscou expandir o estudo de fungos filamentosos, isolados do Parque Nacional de Itatiaia, sob vegetação do bioma Mata Atlântica, em processos de biodegradação de corantes, por esse ambiente ser mais frio do que a média nacional, o que

proporcionaria linhagens com enzimas que conseguiriam atuar em temperaturas mais baixas. O objetivo da pesquisa consistiu em selecionar um fungos com potencial para degradação de corantes têxteis, dentre os fungos filamentosos isolados do Parque Nacional de Itatiaia.

Entende-se que pesquisas nesta área são justificadas por sua importância, não apenas tecnológica, mas social, dado o forte impacto da poluição nas comunidades ribeirinhas. A busca por iniciativas na resolução do problema da disposição de efluentes coloridos é importante em escala global, uma vez que milhões de toneladas de rejeito são geradas anualmente pelas indústrias têxteis (DINIZ, 2015).

A primeira etapa visava a realização de um screening do potencial biotecnológico de degradação de efluentes têxteis em estado sólido por 69 fungos isolados de 8 amostras ambientais. Nesta etapa os corantes Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR), Reactive Black 5 (RB-5) e Rosa Bengala foram testados nas concentrações de 100 e 200 ppm, em meio Agar Malte (pH 5.5) e a presença de zonas de degradação e adsorção foi observada ao fim de 7 e 14 dias a 28°C.

Em seguida, foram realizadas análises espectrofotométricas para a determinação do percentual de descoloração dos corantes RB-5, Reactive Red 120 (RR-120) e Direct Yellow 27 (DY-27) após 7 e 14 dias de fermentação submersa. De posse destes dados, buscou-se obter o percentual de corante efetivamente removido através de uma relação de Lamber-Beer estipulada para cada um dos corantes testados na fermentação submersa.

A linhagem mais promissora foi avaliada através de uma nova abordagem para que o escurecimento do meio de cultivo durante a fermentação submersa pudesse ser relacionado com a degradação dos corantes testados pelas enzimas secretadas pela linhagem fúngica em questão.

O corpo do presente trabalho encontra-se dividido em sete capítulos. Os primeiros dois capítulos, dados pela introdução aqui lida e a revisão da literatura, respectivamente, buscam localizar o prezado leitor no tema da pesquisa e informar sobre a importância dos pontos aqui abordados, assim como levantar os assuntos pertinentes para total compreensão do texto. O Capítulo III apresenta a justificativa da pesquisa e o Capítulo IV traz os objetivos da pesquisa. Já o Capítulo V traz a relação dos materiais e métodos empregados em cada etapa do projeto, assim como o Capítulo VI apresenta e discute os resultados encontrados. Além disso no Capítulo VI é feita uma breve análise de como as enzimas produzidas poderiam ser utilizadas em um processo

industrial e uma breve análise mercadológica é feita. Por fim, o capítulo VII expõe as conclusões e recomendações para pesquisas futuras, respectivamente, fechando a linha de raciocínio dos estudos aqui apresentados. Ao final do texto se encontram as referências bibliográficas utilizadas durante este trabalho.

## CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1 Prospecção da indústria têxtil

#### II.1.2 Mercado Global

A indústria têxtil é uma das maiores e mais antigas indústrias do mundo. Com o avanço da globalização, as indústrias têxteis migraram dos Estados Unidos, Europa e Japão para os países emergentes da Ásia e, mais recentemente, para países do Leste Europeu, norte da África e Caribe, devido aos menores custos de produção quando comparados com os países tradicionais. Este fato alterou o mapa da produção mundial, já que as indústrias se voltaram para os mercados com mão de obra mais barata e com facilidade de acesso a grandes mercados consumidores (BARBOSA, 2013). Estima-se que a indústria têxtil se expanda nos próximos anos para a África devido aos baixos preços de mão de obra e à existência de um importante mercado consumidor, cujo poder de compra está em crescimento.

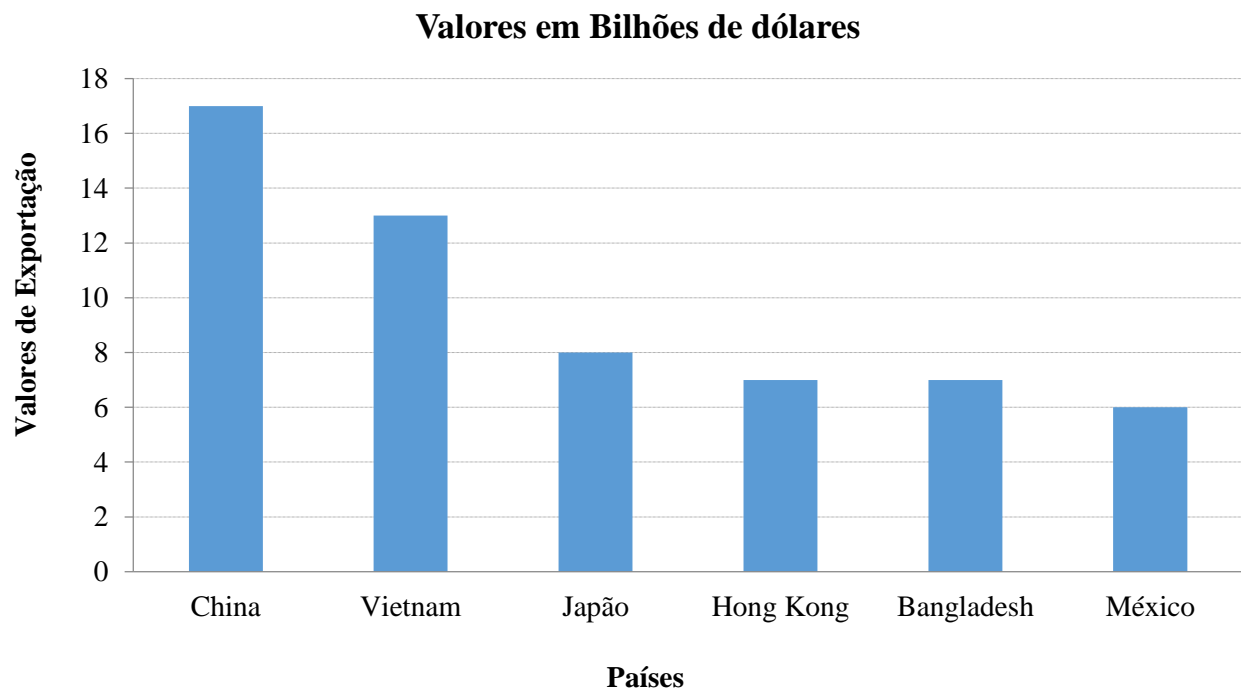
Em 2014, o mercado mundial da indústria têxtil movimentou cerca de US\$ 797 bilhões (OMC, 2015). A partir de projeções feitas pela Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT), estima-se que em 2020 este valor suba para próximo de US\$ 850 bilhões. Segundo dados de 2012 do Instituto de Estudos de Marketing Industrial (IEMI), a Ásia é a região que detém o maior percentual da produção mundial de artigos têxteis, com 73% dos volumes totais. Deste valor, 50,2% do volume mundial são produzidos apenas na China. O Brasil é o único país da América do Sul com posição de destaque na produção têxtil mundial, sendo responsável, em 2013, por 2,4% da produção mundial de artigos têxteis ficando na 5ª posição, vide Tabela I.

Tabela I: Os 5 maiores Produtores Têxteis do Mundo - 2012.

<b>Produção Têxtil</b>	
<b>País</b>	<b>%</b>
China	50,20
India	6,90
Estados Unidos	5,30
Paquistão	3,60
Brasil	2,40

Fonte: OMC (2013).

Segundo a Organização Mundial do comércio (OMC), as exportações têxteis da China no ano de 2016 foram avaliadas em US\$ 106 bilhões, o que equivale a 37,2% das exportações têxteis mundiais. Esses números de exportação são consequência, principalmente, do baixo custo de produção local, diminuição das barreiras comerciais e disponibilidade de fornecimento de material. A posição de segundo maior exportador é ocupada pela União Europeia com aproximadamente 23% das exportações, enquanto a posição dos outros países relevante pode ser visualizada na Figura II-I.



*Figura II-I:10 Os maiores exportadores têxteis no mundo em 2016.*

Por sua vez, o maior importador mundial de artigos têxteis é a União Europeia, com importação aproximada em 2014 de US\$ 69 bilhões (22,9% das importações mundiais), seguido dos Estados Unidos com importação de US\$ 29 bilhões (9,5% das importações mundiais). Ambos têm como principal mercado de compra a Ásia. A Figura II-II apresenta os valores das importações por país/região no ano de 2016.



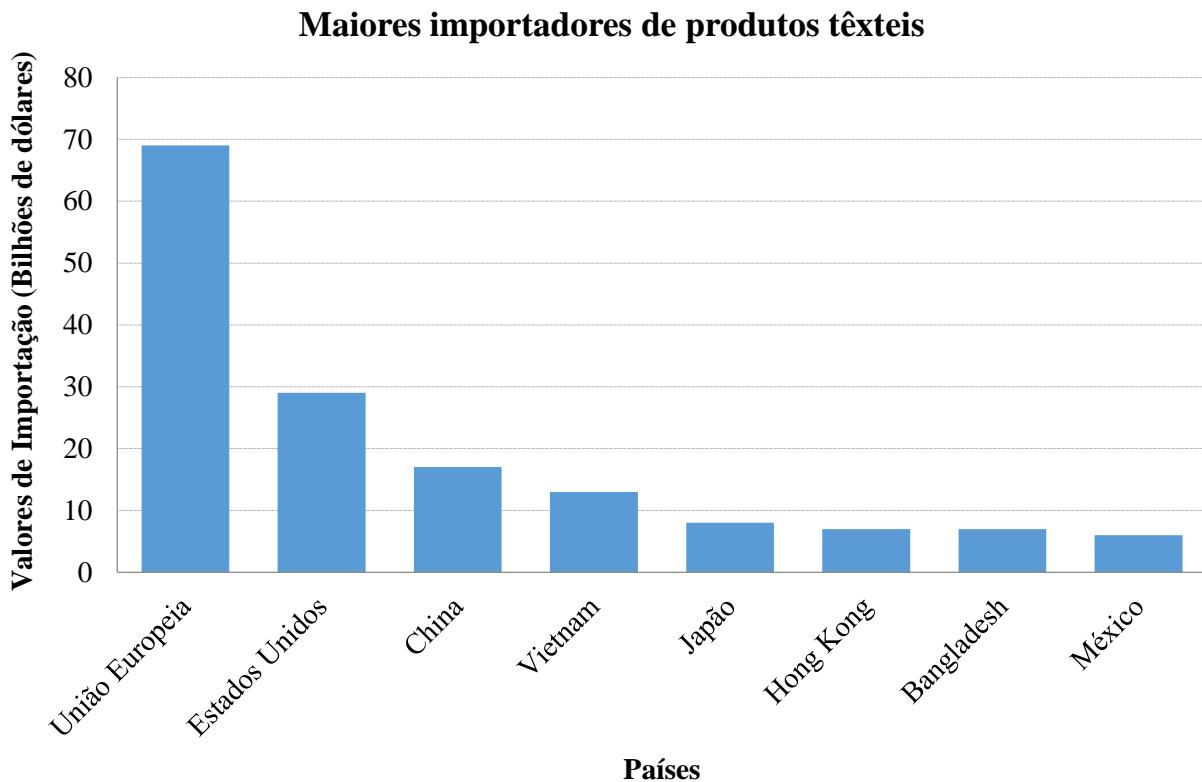


Figura II-II: Os maiores importadores de produtos têxteis no mundo em 2016

É interessante se ressaltar que a indústria têxtil possui um impacto profundo na economia de países em desenvolvimento. Em especial, podemos citar a pesquisa de Keane *et al.*(2008), realizada sobre o papel da Indústria Têxtil e de Vestuário no crescimento de países pouco desenvolvidos, que sugere que esta indústria contribui, em curto prazo, com o fornecimento de renda, empregos e receitas; enquanto, em longo prazo, é responsável por permitir aos países a oportunidade de uma economia mais sólida. Entretanto, o potencial da indústria têxtil melhorar as condições econômicas em um país está diretamente relacionado ao interesse de seus investidores e à capacidade político-administrativa de seus governantes.

### II.1.2 Mercado Brasileiro

Segundo dados da 15ª edição do Relatório Setorial da Indústria Têxtil Brasileira, emitido pela IEMI, a cadeia têxtil brasileira produziu em 2014 cerca de R\$ 126 bilhões, o equivalente a

5,6% do valor total da produção da indústria brasileira de transformação. Embora, segundo dados da ABIT, em 2015, o setor tenha enfrentado uma queda no faturamento, alcançando apenas US\$ 36,2 bilhões. A queda no faturamento veio acompanhada de uma queda na produção têxtil que saiu de 2,2 milhões de toneladas em 2014 para 1,9 milhões de toneladas em 2015.

Contudo, se compararmos o período inicial de janeiro a maio de 2016 com o mesmo período de 2017, presente na Figura II-III, percebe-se um aumento significativo das importações de produtos têxteis. Embora aparentemente a indústria nacional não tenha retomado os valores de produção existentes antes da crise econômica, fica claro que o consumo dos produtos têxteis já vêm apresentando sinais de recuperação (ABIT, 2017).

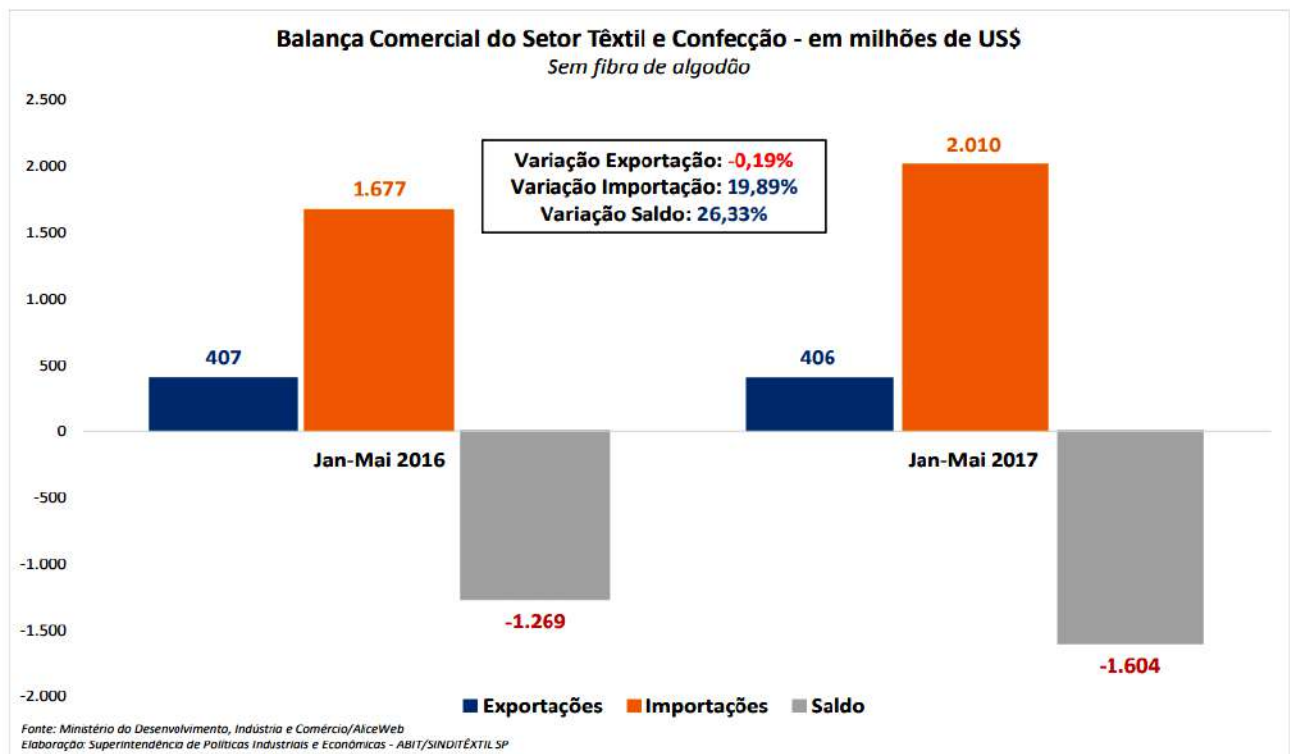


Figura II-III: Balança comercial do setor têxtil de Janeiro a Maio de 2016 x 2017.

Hoje, o Brasil é autossuficiente na produção de algodão e, com a descoberta do pré-sal, especula-se que o país deixe de ser importador para se tornar potencial exportador de material sintético têxtil. Espera-se que a desvalorização do real frente ao dólar americano venha a

contribuir para a redução da presença dos importados no consumo interno, assim como acredita-se que este venha a ser um estímulo à exportação.

Apesar de o Brasil ser um dos grandes produtores mundiais do setor, o país ainda tem uma participação pequena no comércio internacional, reflexo de uma economia voltada ao mercado interno (IEMI, 2012). Nos últimos anos, o país vem se consolidando como um país importador de produtos têxteis e confeccionados. Como consequência, a balança comercial da cadeia têxtil vem, ano a ano, ampliando seu déficit.

Mesmo com a balança comercial negativa, o setor têxtil brasileiro conta com títulos importantes como o quarto maior parque produtivo de confecção do mundo, quinto maior produtor têxtil do mundo, quarto maior produtor de malhas do mundo, além de ser a única cadeia têxtil completa no Ocidente (ABIT, 2016).

Além disso, o setor têxtil é o gerador de 1,5 milhão de postos de emprego diretos, o equivalente a 16,7% do total de trabalhadores alocados na produção industrial em 2015, e mais 8 milhões de empregos indiretos, dos quais 75% são de mão de obra feminina, o setor têxtil brasileiro é o segundo maior empregador da indústria de transformação, perdendo apenas para a indústria de alimentos e bebidas, segundo dados da ABIT.

Formado por cerca de 33 mil empresas formais em todo o país, o setor encontra-se localizado principalmente na região sudeste, onde se destaca o estado de São Paulo. Ainda segundo dados do IEMI, a região sudeste concentra os maiores mercados consumidores e principais centros de distribuição de atacado e varejo. Porém, atualmente o sudeste vem perdendo parcelas significativas de sua participação para as regiões do Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país, uma vez que o custo de produção nestas regiões é mais baixo e associando-se este fato com a presença de um mercado consumidor em expansão, é criado um ambiente favorável à migração industrial. A presença do setor em cada região é destacada na Figura II-IV.



Figura II-IV: Distribuição da indústria têxtil no país. Em destaque encontram-se as regiões mais relevantes (ALMEIDA, 2017).

Atualmente no Brasil o segmento têxtil apresenta grande relevância econômica e um impacto social positivo. Embora os números mais recentes indiquem um cenário com ainda muitas incertezas para os empresários têxteis, devido à persistência da crise econômica e política no país, a economia já mostra sinais de recuperação, o que deve voltar a aumentar os investimentos neste setor. Vale ressaltar que o presidente da ABIT, Rafael Cervone, expõe a importância dos investimentos no setor, principalmente em áreas de pesquisa e inovação, para o aumento de competitividade da indústria nacional.

Assim, ressalta-se a importância do presente trabalho, uma vez que processos biotecnológicos modernos podem reduzir significativamente o custo operacional das indústrias têxteis brasileiras, frente às indústrias estrangeiras, permitindo uma maior competitividade da indústria nacional e reduzindo o déficit comercial.

## II.2 Processo de Tingimento

O tingimento de tecidos é uma técnica secular que consiste na fixação de um corante na fibra têxtil. As tecnologias modernas empregadas nos tingimentos são compostas de dezenas de etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais,

classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, além de considerações econômicas

Durante o tingimento existem duas etapas que são consideradas essenciais: a fixação e o tratamento final. A fixação do corante na fibra é feita através de uma reação química, o que faz com que o corante fique aderido à fibra sendo resistente à oxidação pela luz, lavagem, transpiração e ao atrito natural que sofrerá durante a vida útil da fibra.

Para que isto ocorra, é necessário que o corante possua alta afinidade pelas fibras, além de ser economicamente viável a sua utilização pela indústria. Já a lavagem consiste na imersão das fibras têxteis já coradas em água, de forma a garantir a retirada do excesso de corante não fixado à fibra. As fibras naturais mais utilizadas são formadas por celulose e proteínas, já as sintéticas por acetato de celulose, poliamida, poliéster e acrílico (GUARATINI *et al.*, 1999). As estruturas químicas das principais fibras estão expostas na Figura II-V.

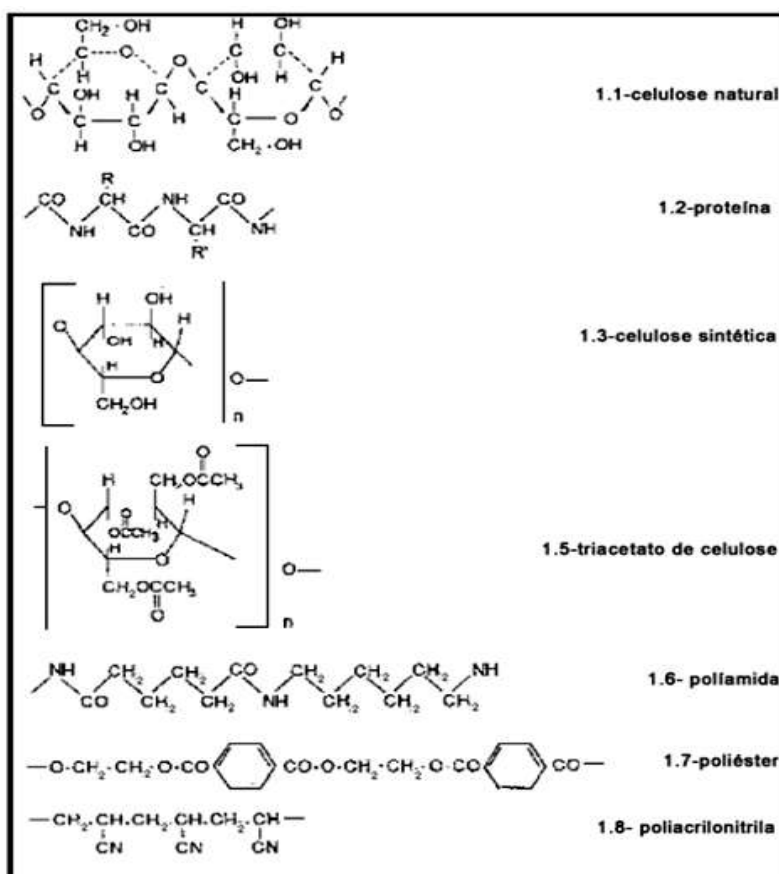


Figura II-V: Estrutura química dos principais grupos presentes em fibras têxteis (GUARATINI *et al.*, 1999).

## II.2.1 Fixação do Corante

A fixação da molécula do corante às fibras supracitadas geralmente é feita em solução aquosa e envolve, basicamente, 4 tipos de interações: ligações iônicas, interações por pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals e ligações covalentes (LIMA DE SOUZA, 2006).

**Interações Iônicas** – Baseiam-se em interações entre o centro positivo dos grupos amino e carboxilatos presentes na fibra e a carga iônica da molécula do corante. Este tipo de interação é normalmente encontrado no tingimento da lã, seda e poliamida, um exemplo se encontra abaixo na Figura II-VI.

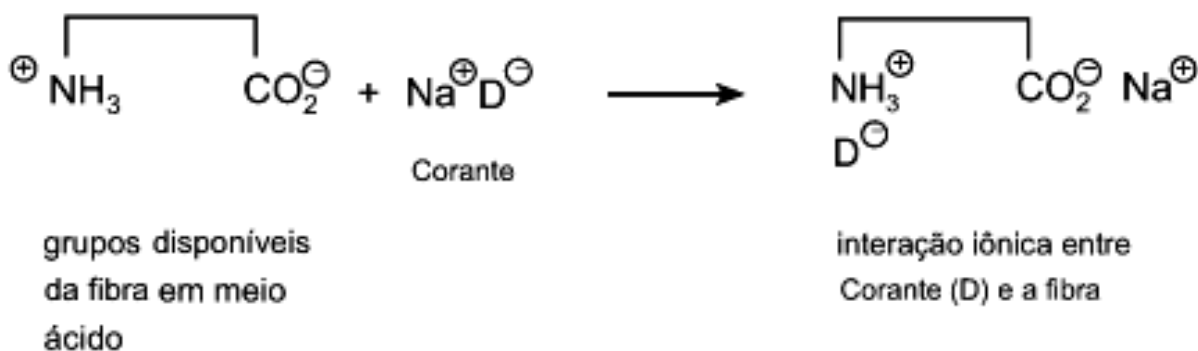


Figura II-VI: Exemplo da interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã (Fonte: GUARATINI et al., 1999).

**Interações de Van der Waals** – Tem como base a interação proveniente da aproximação máxima entre orbitais  $\pi$  do corante e da molécula da fibra, de tal modo que as moléculas do corante são fixadas firmemente sobre a fibra por um processo de afinidade, sem formar uma ligação propriamente dita. Esta atração é especialmente efetiva quando a molécula do corante é linear/longa e/ou achatada, podendo se aproximar o máximo possível da molécula da fibra. Este tipo de interação é normalmente encontrado na tintura de lã e poliéster com corantes com alta afinidade por celulose.

**Interações de Hidrogênio** – Baseiam-se na ligação entre átomos de hidrogênio covalentemente ligados no corante e pares de elétrons livres de átomos doadores em centros presentes na fibra. São encontradas na tintura de lã, seda e fibras sintéticas, um exemplo se encontra na Figura II-VII.

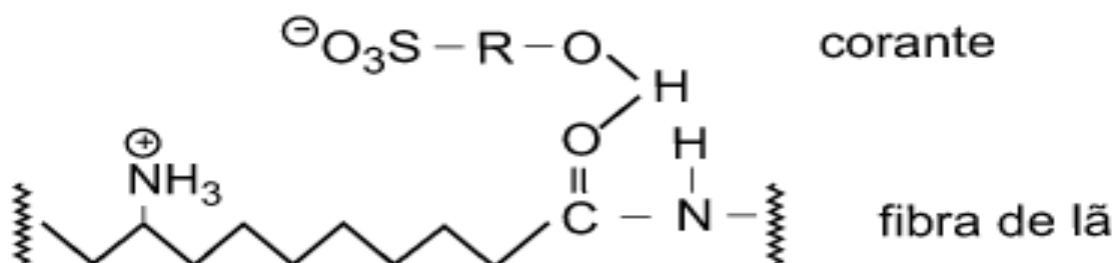


Figura II-VII: Exemplo da interação de hidrogênio entre o corante sulfonado e os grupos carboxilas da fibra de lã (Fonte: Guaratini et al., 1999).

**Interações Covalentes** – Geradas na formação de uma ligação covalente entre a molécula do corante contendo um grupo eletrofílico e resíduos nucleofílicos da fibra. Ocorrem em algumas tinturas de fibra de algodão, abaixo se encontra um exemplo deste tipo de interação na Figura II-VIII.

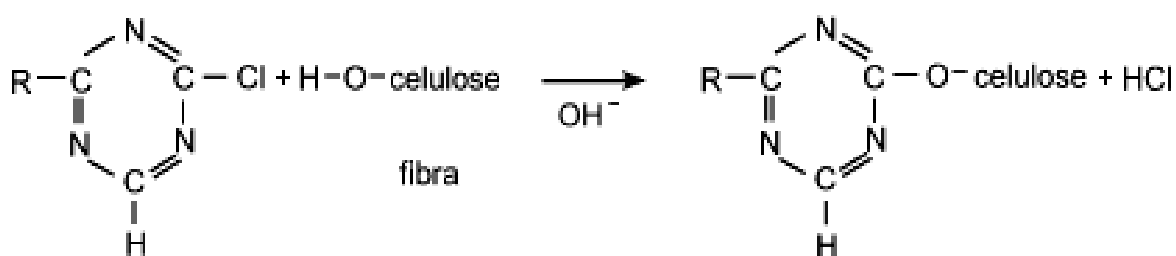


Figura II-VIII: Exemplo da interação covalente entre um corante contendo grupos reativos (triazina) e grupos hidroxila presentes na celulose da fibra de algodão. (Fonte: GUARATINI et al., 1999).

### II.3 Tipos de Corantes

Utilizando a estrutura química como critério de classificação, os corantes podem ser subdivididos em várias classes, destacam-se aqui as mais importantes: Azo, nitrofenol,

nitrosofenol, trifenilmetano, antraquinona, ftalocianina, vinilsulfônico, pirimidina e triazina (LIMA DE SOUZA, 2006; TWARDOKUS, 2004).

Habitualmente, são classificados segundo o tipo de interação com a fibra têxtil, sendo os principais grupos de corantes os corantes reativos, diretos, azóicos, ácidos, dispersivos e xantenos, a seguir são destacados os tipos trabalhados neste projeto:

### II.3.1 Corantes Reativos

Corantes utilizados principalmente em fibras celulósicas. Possuem um grupo eletrofílico que é capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras da celulose e também com grupos amino das poliamidas. Existe uma grande variedade de tipos de corantes reativos, entretando, aqueles que possuem como grupos cromóforos as funções azo e antraquinona, e como grupos reativos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila são os principais representantes. Nesta classe de corantes, a interação com a fibra é feita através de uma ligação covalente onde o grupo nucleofílico do corante é substituído pelo grupo hidroxila da celulose. Um exemplo é o tingimento usando compostos contendo sulfatoetilsulfona, cuja ligação do corante à fibra requer apenas a prévia eliminação do grupo sulfato em meio alcalino gerando o composto vinilsulfona, conforme pode ser visto na Figura II-IX.

Em meio básico:

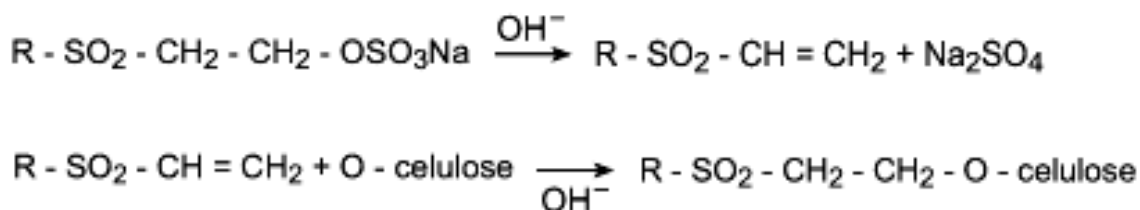


Figura II-IX: Exemplo do processo de tintura de algodão com corante contendo o grupo sulfatoetilsulfona como centro reativo da molécula (Retirado de GUARATINI et al., 1999).

Este grupo de corantes apresenta como principal característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de ligações covalentes entre o corante e a fibra, ligação esta que



confere grande estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corante onde o processo de coloração se opera através de outros mecanismos.

Dentre os corantes utilizados neste projeto, destaca-se o corante Remazol Brilliant Blue Reactive (RBBR), cujo grupo cromóforo é o antraquinona. Os corantes com grupo cromóforo antraquinona possuem cores menos vivas que as cores obtidas pela utilização dos corantes azo, mas, em contrapartida, a resistência a luz e a agentes redutores e oxidantes é superior nesta categoria devido à sua estrutura aromática (antraquinona), altamente estabilizada por ressonância (DAMAZIO & MAGDALENA, 2016).

O corante RBBR é um corante reativo resistente à oxidação química, devido ao fato de sua estrutura antraquinona ser altamente estabilizada por ressonância (Figura II-X). Além disso, o corante é amplamente utilizado na indústria têxtil e tem pouca capacidade de fixação (75-80%) devido à posição entre a formação de vinilsulfona e as reações de hidrólise. Desta maneira, a estratégia para eliminar a cor e reduzir o seu efeito sobre os corpos de água naturais é de significativa importância.

Já outro corante da classe reativo utilizado neste trabalho foi o corante Reactive Black 5 (RB-5) que pertence ao grupo dos corantes azóicos. O corante RB-5 é um dos mais comuns do tipo reativo, sendo empregado com frequência na indústria de corantes (Figura II-X), já que este corante é altamente solúvel em água e tem grupos reativos que podem formar ligações covalentes entre o corante e a fibra. O corante RB-5 é o mais utilizado para tingir algodão e outras fibras celulósicas como lã e nylon (MOHAMED BOURAIE, WALAA DIN, 2016).

Esse corante foi selecionado como um composto de estudo devido à sua incompleta reação de fixação com a celulose. A razão disso é a competição entre a reação de grupos reativos vinilsulfonas com a fibra, e a hidrólise de grupos vinilsulfonas carregando grupos (2-hidroxiethyl)sulfona. Os grupos (2-hidroxiethyl) sulfona não reagem com as fibras resultando em uma baixa eficiência do processo de tingimento (MOHAMED BOURAIE, WALAA DIN, 2016).

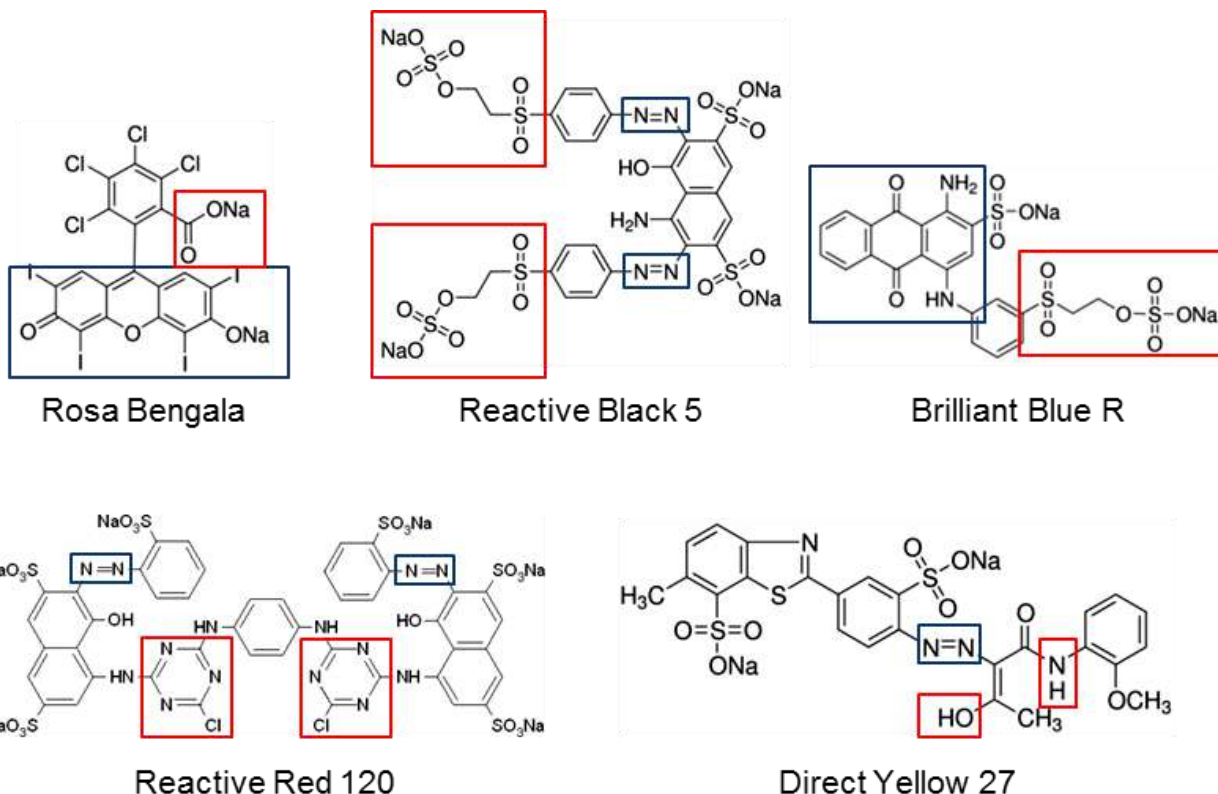


Figura II-X: Exemplo de algumas estruturas químicas de corantes, indicando seus respectivos grupos cromóforos (Azul) e ligantes entre a fibra e o corante (Vermelho). (DAMAZIO & MAGDALENA, 2016).

### II.3.2 Corantes Diretos

Estes corantes caracterizam-se também por serem solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações do tipo Van der Waals. A afinidade do corante pelo substrato pode ser aumentada utilizando um eletrólito, pela planaridade na configuração da molécula do corante, ou a dupla-ligação conjugada, que favorece o aumento da adsorção do corante sobre a fibra. Esta classe é constituída principalmente por corantes contendo um ou mais grupo azo (diazo, triazo e etc.).

Os corantes diretos possuem como principal vantagem o seu alto grau de exaustão, que está relacionado com a fixação do corante à fibra, o que leva a um baixo teor do mesmo no efluente. Como exemplo dessa classe tem-se o corante DY-27, utilizado no presente trabalho. Por outro lado, os corantes ácidos correspondem a um grande grupo de corantes aniônicos, que recebem essa denominação por serem aplicados ao tecido junto à soluções ácidas. Esse grupo

tem vital importância para tingimento de fibras proteicas e poliamida sintética (GUARATINI & ZANONI, 2000).

### II.3.3 Corantes Azóicos

Os corantes azóicos são compostos coloridos, insolúveis em água, sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento, o que permite um método de tingimento de fibras celulósicas com alta fixação e com resistência contra a luz e a umidade. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento (e.g. naftol) que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio ( $RN_2^+$ ) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água (GUARATINI *et al.*, 1999).

Cerca de 70% dos corantes utilizados em indústrias têxteis são corantes azos, que se caracterizam pela função  $-N=N-$  ligado a grupos aromáticos (Figura II-XI). Esses corantes são particularmente problemáticos porque apresentam pouca fixação na fibra e, dessa forma, aproximadamente 10 a 20% do total de corantes utilizados no processo de tingimento são descartados como efluentes (BARRETO *et al.*, 2011).

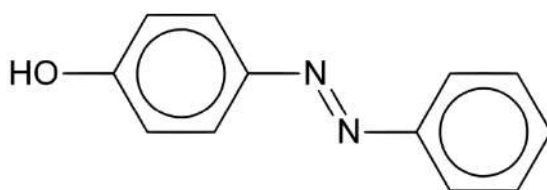


Figura II-XI: Exemplo de composto azóico, 4-hidroxifenilazobenzeno (Sigma-Aldrich, 2018)

Os corantes azo são o maior grupo de corantes sintéticos produzidos mundialmente, representando quase 70% do uso de corantes têxteis. O grande emprego de corantes azo pode ser explicado pelo fato de serem facilmente sintetizados e possuírem baixo custo de produção e alta estabilidade. Entretanto, eles são considerados os corantes mais perigosos, especialmente por sua alta estabilidade e por sua biotransformação gerar aminas, benzidinas e outros intermediários

com potencial carcinogênico. Como consequência, existem muitas pesquisas conduzidas com foco nesta classe de corante objetivando a diminuição de seu impacto ambiental (GUARATANI & ZANONI, 2000).

### **II.3.6 Corantes Xantenos**

Por sua vez, os corantes classificados como xantenos tem baixa solubilidade em água e, para aumentá-la, as moléculas são modificadas por ligações de grupos sulfonados (MACEDO, 2012). Esses corantes tendem a ser fluorescentes e, como exemplo usado nesse trabalho, tem-se o corante Rosa Bengala. Como representante da classe xanteno, o Rosa Bengala é um corante pouco tóxico que possui uma aplicação mais ampla na área médica, do que para o efetivo tingimento de tecidos. Utiliza-se este corante para diagnósticos, observação de danos na córnea através da sua aplicação em colírios, e têm sido realizados avanços no seu emprego para o tratamento de células cancerígenas.

Esse corante foi selecionado para integrar as análises, por possuir baixa toxicidade. Ele deve permitir o crescimento fúngico no meio sólido adicionado de corante, além de ser um corante da classe xanteno e possuir estrutura simples quando comparado aos outros corantes de análise que são na sua maioria corantes diretos.

### **II.4 Rejeitos Industriais**

Os corantes tem sido um dos maiores responsáveis pela poluição de corpos hídricos no mundo. O fato de a indústria têxtil utilizar grandes quantidades de água associado ao baixo aproveitamento dos insumos faz com que esta seja responsável pela produção de significativos volumes de resíduos, com alta carga orgânica e forte coloração (ASGHAR *et al.*, 2015). A contaminação dos corpos de água e o consequente comprometimento destes têm levado à realização de estudos com o intuito de desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais (BARRETO *et al.*, 2011).

Nos países em desenvolvimento cerca de 70% dos efluentes industriais são despejados em corpos hídricos sem qualquer tratamento (SANTOS, 2015). Estima-se que cerca de 80 a 150 litros de água sejam utilizados a cada quilo de produto fabricado. Desse total, cerca de 88% da água é liberada no ambiente na forma de efluente (DINIZ, 2015). O elevado consumo de água demandado por este setor industrial decorre, principalmente, das operações de beneficiamento e lavagem de fios e tecidos, como pode ser visto na Figura II-XII, além da higienização de plantas e equipamentos.

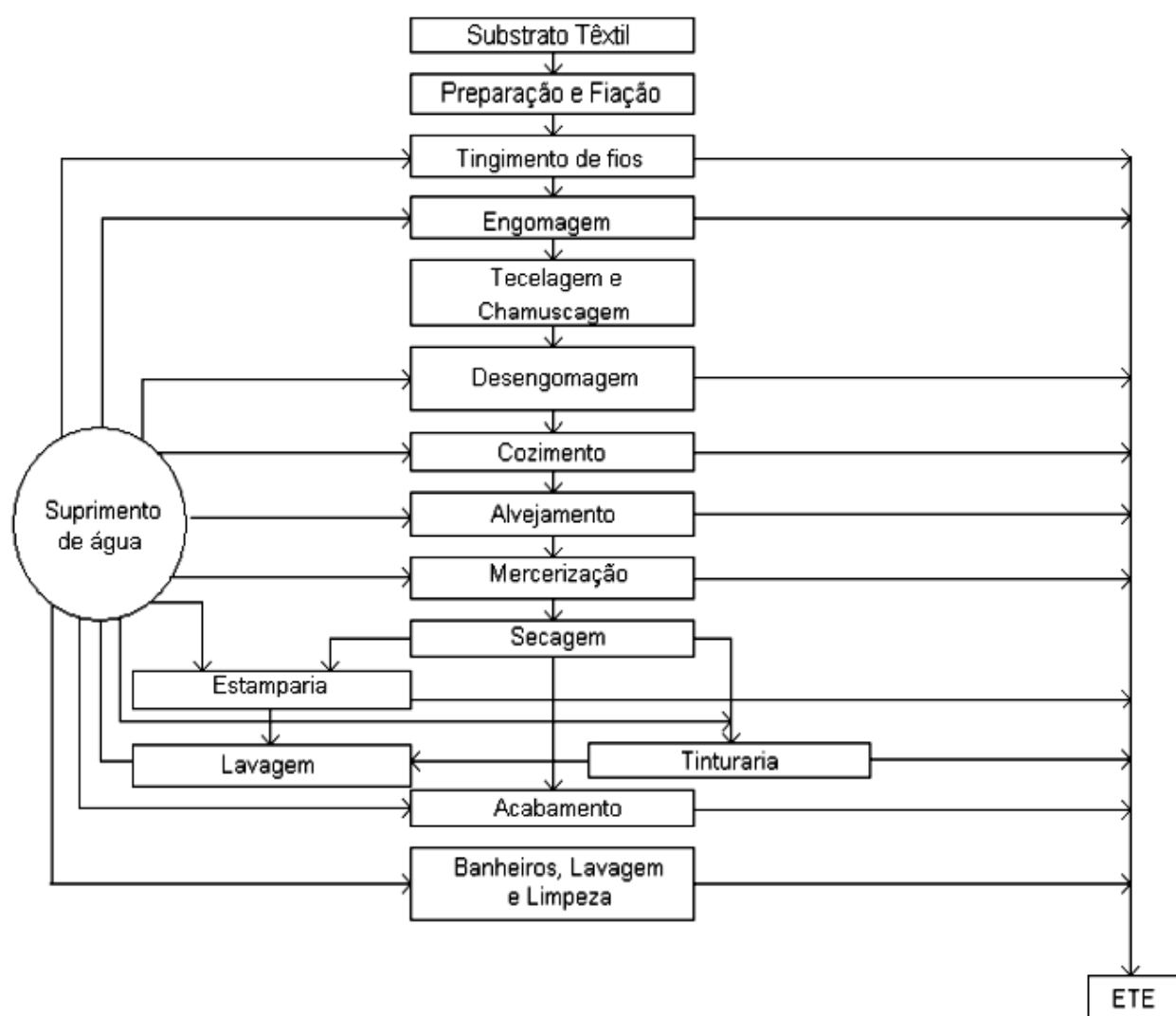


Figura II-XII: Mapa do uso de água em etapas características do Processamento de Tecidos. (Fonte: BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

Os efluentes têxteis gerados na etapa de beneficiamento apresentam características como cor intensa, devido à grande quantidade de corantes não fixados e descartados; concentração de matéria orgânica equivalente a de esgoto doméstico; altas concentrações de compostos organo-halogenados adsorvíveis (AOX), sulfitos e metais pesados, encontrados nos alvejantes e halógenos; altas concentrações de enxofre ou metais, muitas vezes presentes na estrutura de alguns corantes; altas temperaturas, devido ao emprego de calor em algumas etapas do processamento; e grande demanda química de oxigênio (DQO) refratária dada pelo uso de corantes de alta massa molar. Entretanto, embora possam ser enumerados os componentes mais usuais presentes nos efluentes, sua composição é primariamente oscilante uma vez que depende das técnicas empregadas no processo e estas, por sua vez, variam de acordo com o produto e a matéria prima (LIM *et al.*, 2010).

Apesar da composição rica em rejeitos tóxicos, os corantes são o maior inconveniente presente nos efluentes têxteis, pois mesmo em concentrações muito baixas (1 mg/L) são nitidamente visíveis e possuem meia-vida elevada. O grau de fixação dos corantes nos tecidos constitui um agravante, uma vez que, embora seus valores sejam flutuantes e dependentes de especificações técnicas locais, a fixação nunca é completa, resultando em altas cargas de corantes nas águas residuais (LIM *et al.*, 2010). Um exemplo de como a carga orgânica pode influenciar os corpos d'água se encontra na Figura II-XIII.



Figura II-XIII:Rio Jianhe, China, após poluição industrial. (Fonte Reuters).

Quando não tratados adequadamente, os efluentes provenientes do processo de tingimento de fibras têxteis podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, o que pode alterar a atividade fotossintética e o regime de solubilidade dos gases (LIM *et al.*, 2010).

#### **II.4.2 Tratamento de Efluentes**

Os processos destinados ao tratamento de efluentes industriais objetivam a transformação das espécies responsáveis pela poluição ambiental, em formas inócuas que não ofereçam riscos de impacto ambiental (BRITO *et al.*, 2004). Os processos de tratamento de efluentes da indústria têxtil estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos, seguidos de tratamento biológico. Os processos de tratamentos biotecnológicos como por exemplo lodos ativados e lagoas aeradas continuam sendo intensamente pesquisados, principalmente devido a

possibilidade de aplicação em larga escala com baixos custos(LADE *et al.*, 2012). A Tabela II resume os sistemas de tratamento de efluentes têxteis.

*Tabela II: Processos convencionais de tratamento de efluente.*

<b>Tratamento</b>	<b>Tipo de Processo</b>	<b>Operação Unitária</b>
Preliminar	Físico	Gradeamento Equalização
	Químico	Neutralização
Primário	Físico	Clarificação Sedimentação
		Flotação
	Químico	Coagulação Precipitação
Secundário	Biológico	Lodos Ativados Lagoas de Aeração Filtros Biológicos
Terciário ou Avançado	Físico	Carvão Ativo Ultrafiltração
		Osiose Reversa
	Químico	Oxidação Avançada

Fonte: Adaptado de PERES, 1998



O tratamento preliminar é utilizado para remoção de sólidos suspensos grosseiros. Já os tratamentos primários são utilizados para remoção de sólidos suspensos sedimentáveis. Os tratamentos secundários, por sua vez, têm como função principal a remoção de matéria orgânica biodegradável, tanto em suspensão quanto dissolvida. Finalmente, os tratamentos terciários ou avançados normalmente são empregados com a finalidade de reciclagem da água e/ou produtos para o processo produtivo. Para isso, envolvem combinações de operações unitárias para um fim específico como, por exemplo, desinfecção, remoção de nutrientes e de compostos recalcitrantes e eliminação de cor (ALMEIDA, 2017).

No que diz respeito à remoção da cor do efluente têxtil, destacam-se os processos de adsorção, oxidação avançada e separação por membrana, técnicas essas que têm mostrado elevada eficiência na descoloração (KUNZ et al., 2002) porém, ainda apresentam algumas desvantagens e limitações de uso, como a geração de resíduos sólidos altamente poluentes, custo e formação de subprodutos tóxicos. Por isto, a utilização de microorganismos que utilizam efluentes como fonte de nutrientes apresenta um grande potencial, uma vez que não há um custo elevado de operação (LIM et al., 2010) além de não gerarem resíduos sólidos poluentes ao final, se não promoverem a adsorção ou bioacumulação dos compostos em suas células.

## **II.5 Uso de Micro-organismos na Biotecnologia**

Os micro-organismos são extremamente importantes na ciclagem de nutrientes. Fungos e bactérias participam efetivamente dos ciclos biogeoquímicos do carbono, oxigênio, nitrogênio, ferro e enxofre, disponibilizando esses nutrientes para outros organismos da teia trófica (CATHRINE & RAGHUKUMAR, 2008; BALDRIAN, 2009). O principal papel dos microrganismos na degradação de compostos orgânicos é sua transformação bioquímica em compostos menos complexos através da produção de enzimas extracelulares ou intracelulares (LEVIN et al., 2010).

### II.5.1 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos eucariotos, multicelulares conhecidos por apresentarem significativa capacidade de decompor a matéria orgânica no solo. A estimativa é de que existam 1,5 milhões de espécies de fungos, porém, segundo Hawksworth (2012), esta estimativa pode ser ampliada em até 3 milhões. Algumas espécies de fungos podem ser consideradas patógenas para humanos, animais e plantas, enquanto outras estabelecem relações simbióticas com estes organismos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Baseados em sua morfologia, os fungos podem ser classificados como leveduriformes ou filamentosos, sendo unicelulares ou multicelulares, respectivamente. São seres quimiorganotróficos e geralmente aeróbios. Sua nutrição é realizada por meio de enzimas extracelulares produzidas por esses organismos, que são capazes de hidrolisar materiais como polissacarídeos e proteínas encontradas no meio (MADIGAN *et al.*, 2016).

Como organismos decompositores, os fungos têm a capacidade não apenas de capturar os nutrientes do meio, mas também de quebrar materiais insolúveis, transformando-os em componentes solúveis, dos quais irão se alimentar.

Como muitos compostos orgânicos complexos (contendo anéis aromáticos e se assemelhando a compostos xenobiontes) são degradados por fungos filamentosos, os mesmos tem sido fonte de inúmeras pesquisas visando a biodegradação de compostos recalcitrantes (KALPANA *et al.*, 2012; BONUGLI-SANTOS, 2010; MIQUELANTE, 2011; TORRES *et al.*, 2011).

O alto poder de degradação de moléculas complexas por certas espécies de fungos está baseado na produção de enzimas extracelulares, que fornecem aos fungos meios para a obtenção de energia e nutrientes (LEVIN *et al.*, 2010).

Devido à necessidade de se adotar técnicas de tratamentos de efluentes mais eficientes, o emprego de microrganismos vêm sendo intensamente estudado, já que pesquisas apontam que o seu baixo custo associado à possibilidade de degradação de compostos recalcitrantes fazem dos fungos e bactérias opções viáveis para o beneficiamento de determinados efluentes líquidos e sólidos.

Fungos lignolíticos podem oxidar compostos fenólicos através da produção de um complexo enzimático extracelular não específico que é normalmente utilizado para a despolimerização da lignina. As enzimas que são responsáveis pela degradação da lignina são normalmente a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e as lacases. O outro caminho metabólico para a degradação de compostos fenólicos realiza a hidroxilação pelo citocromo P-450 monooxigenase através da sequência de reações descritas a seguir (PASSARINI *et al.*, 2011), na *Figura II-XIV*.

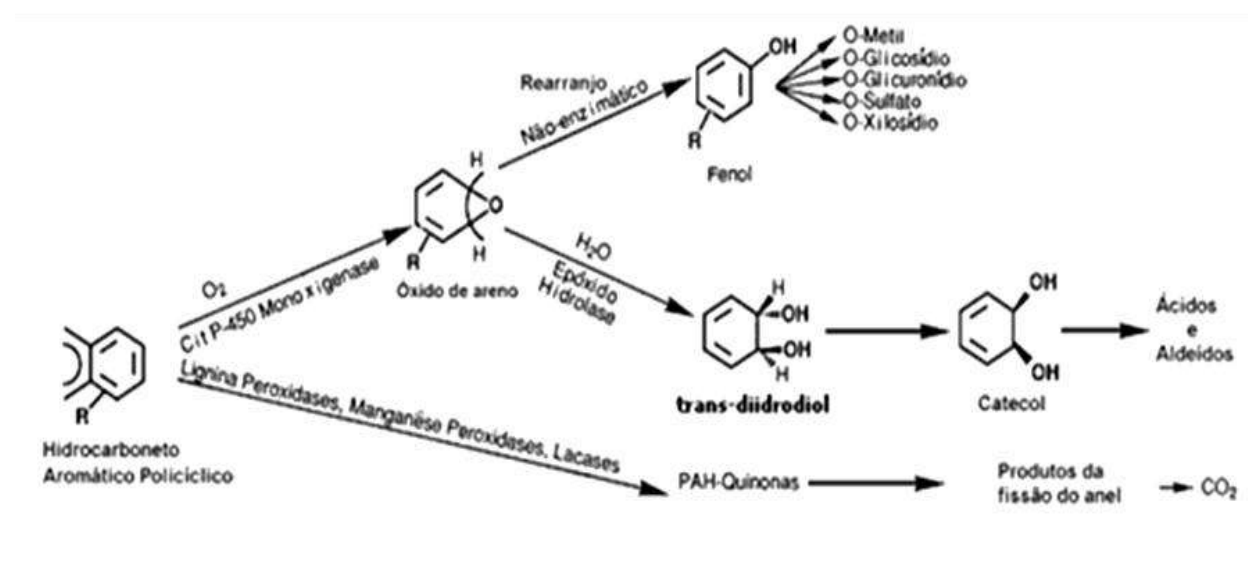


Figura II-XIV: Caminhos metabólicos utilizados por fungos na degradação de compostos aromáticos (ALMEIDA, 2018).

### II.5.1.1 Enzimas Extracelulares

As principais enzimas extracelulares incluem as celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases. Devido a grande produção de enzimas em diversos substratos, os fungos filamentosos são micro-organismos que apresentam um importante potencial biotecnológico.

A atividade de enzimas hidrolíticas e lignolíticas afeta diretamente as taxas de transformação de biopolímeros do solo em compostos que são acessíveis para outros micro-organismos e para as plantas. Fungos filamentosos são frequentemente descritos como produtores de enzimas com atividade degradadora de polímeros complexos e estas atividades

possuem aplicações industriais e ambientais (BALDRIAN, 2009). Os fungos envolvidos na degradação da lignina secretam diferentes enzimas extracelulares, chamadas de ligninolíticas, que catalisam reações que levam à degradação do polímero. Levando-se em consideração a complexidade da molécula da lignina, as enzimas capazes de degradar esse polímero são amplamente estudadas na degradação de diversos compostos formados por estruturas complexas, como por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os clorofenóis e os bifenilos policlorados (BUGG *et al.*, 2010).

Os fungos filamentosos são os principais micro-organismos produtores de enzimas lignolíticas. Eles apresentam um sistema lignolítico oxidativo e extracelular que degrada lignina e abre anéis fenólicos. As principais enzimas responsáveis pela degradação da lignina são: a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e a lacase (SÁNCHEZ, 2009; LEVIN *et al.*, 2010). As reações que são catalisadas por estas enzimas podem ser encontradas na Tabela III.

*Tabela III: Reações catalisadas pelas enzimas extracelulares envolvidas no processo de degradação de corantes (ALMEIDA, 2018).*

<b>Enzima</b>	<b>Reação Catalisada</b>
Lignina Peroxidase	Oxidação de álcoois benzílicos
	Abertura de anéis aromáticos
	Clivagens de ligações C-C
	Clivanges de Ligações C-O
	Polimerização de fenóis
Manganês Peroxidase	Clivagens de ligações C-C
	Clivages de Ligações C-O
	Oxidação de fenóis
Lacase	Clivagens de ligações C-C
	Clivages de Ligações C-O
	Oxidação de fenóis

### II.5.1.2 Degradação de Corantes por Fungos Filamentosos

Fungos da podridão branca, em sua maioria pertencentes ao Filo Basidiomycota, são os mais extensivamente estudados quanto à produção de enzimas lignolíticas e, portanto, degradação de corantes têxteis (LEVIN *et al.*, 2010). Apesar disso, diversos registros demonstram a produção de enzimas lignolíticas e descoloração de corantes têxteis por fungos pertencentes ao Filo Ascomycota, como *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (BONUGLI-SANTOS, 2010; MIQUELANTE, 2011; TORRES *et al.*, 2011). A remoção de cor por fungos filamentosos pode acontecer de duas maneiras: por bioissorção, um fenômeno passivo de sequestro e separação do poluente da fase aquosa para uma fase sólida (MIQUELANTE, 2011); e por biodegradação enzimática, que consiste na modificação estrutural do poluente via processo enzimático (KALPANA *et al.*, 2012). No entanto, um ou ambos mecanismos podem participar da descoloração, dependendo do fungo utilizado, como demonstrado por Bergstein-Torralba (2008).

As rotas biotecnológicas convergem para a utilização de fungos basidiomicetos, como mediadores da biodegradação de uma grande variedade de compostos aromáticos e de corantes, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (SARAYU & SANDHYA, 2012). A habilidade dos fungos da decomposição branca é oxidar compostos fenólicos, que na maioria das vezes está associada a enzimas extracelulares ligninolíticas (LEVIN *et al.*, 2010), como as fenoloxidasas e peroxidases, que representam o maior grupo de enzimas que catalisam a oxidação de compostos aromáticos (BARRETO *et al.*, 2011).

Assim, trabalhos sobre a utilização de fungos em processos de biorremediação são fundamentais, na

*Tabela IV* podem ser encontrados alguns exemplos de fungos reconhecidos pela literatura na degradação de compostos fenólicos.

Tabela IV: Relação de alguns fungos da podridão branca capazes de descolorir corantes sintéticos.

<b>Fungo</b>	<b>Corantes</b>	<b>Taxa de descoloração (%)</b>	<b>Tempo (dias)</b>
<i>Phellinus gilrus</i>	CI Vat Blue I	100	4
<i>Pleurotus sojar-caju</i>	Sp-g (diazó)	89	28
<i>Phanerochaete cryosporum</i>	Cm-s (diazó)	88	
	Brilhant green	100	
	Cristal violeta	95,2	
	Vermelho cresol	81,4	5
<i>Phlebia floridensis</i>	Vermelho congo	98	
	Orange II	100	
	Poly-B	93	9
	Poly-R	80	5
	RBBR	93	9

Fonte: ALMEIDA, 2017

### CAPÍTULO III – JUSTIFICATIVA

Anualmente, uma grande carga de efluentes têxteis é gerada a partir dos processos de tingimento de tecidos em escala industrial. Estes efluentes que apresentam diferentes origens e diferentes composições químicas são caracterizados por apresentarem uma elevada resistência à degradação, além de serem tóxicos (LIM *et al.*, 2010).

Por esse motivo, é necessária a elaboração de sistemas de tratamento de efluentes mais eficientes e baratos, de forma que o tratamento desses compostos se torne menos onerosa para a indústria.

O tratamento atualmente é efetuado através de sistemas de coagulação-precipitação, seguido por tratamento com lodos ativados, contudo esses processos têm desvantagens financeiras e de metodologia, além de serem pouco efetivos e consumirem muito tempo (SARAYU & SANDHYA, 2012).

Os tratamentos terciários que são realizados após o tratamento com lodos ativados visam principalmente remover os corantes ainda presentes neste efluente e também adequar os rejeitos de acordo com a legislação ambiental vigente. Contudo, todos os processos terciários utilizados atualmente possuem defeitos, como a geração de compostos sólidos tóxicos que tem que ser dispostos ou elevados custos (ALMEIDA, 2017).

A utilização de fungos, especialmente basidiomicetos, na degradação de compostos fenólicos é reconhecidamente importante devido á sua ampla gama de enzimas extracelulares que são produzidas. Estas enzimas atuam na catalisação de reações de oxidação dos compostos fenólicos o que é algo complexo de ser realizado de outra forma.

Assim, o presente trabalho visa promover a bioprospecção de linhagens fúngicas selvagens, selecionando as linhagens promissoras para o tratamento de efluentes em escala industrial. Além disso, será proposta uma utilização industrial da linhagem fúngica mais

promissora, de modo que possa ser elaborado um processo terciário de remoção de compostos recalcitrantes utilizando este fungo.

## **CAPÍTULO IV –OBJETIVOS**

### **IV.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como principal objetivo a avaliação do potencial biotecnológico de 69 fungos em degradar corantes empregados na indústria têxtil. Esses foram isolados de 8 amostras ambientais coletadas na parte alta do Parque Nacional de Itatiaia. Isto foi realizado para que se possa identificar qual seria a linhagem fúngica mais promissora na degradação de corantes têxteis de modo a selecioná-la para futuros projetos industriais.

### **IV.2 Objetivos Específicos**

- Promover o isolamento dos micro-organismos obtidos a partir das amostras de solo e serapilheira coletados;
- Efetuar um screening promovendo o crescimento dos 69 fungos em meio sólidos contendo 3 corantes de interesse em duas concentrações;
- Avaliar o potencial biotecnológico dos fungos presentes em cada amostra, de modo a selecionar os mais promissores na degradação de corantes têxteis;
- Identificar em nível de gênero os fungos com elevada degradação dos corantes testados;
- Testar em um processo submerso os fungos com maior potencial biotecnológico, avaliando o percentual de corante degradado;
- Testar o poder de degradação dos corantes pelas enzimas extracelulares produzidas pelos fungos a fim de evitar a produção de substâncias cromóforas pelos fungos durante a fermentação.



## CAPÍTULO V – MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos (LEPM) e no laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos (BIOSE), coordenado pela Prof. Maria Alice Zarur Coelho e pelo professor Bernardo Dias Ribeiro, ambos localizados na Escola de Química, no Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### V.1 Coleta das Amostras

Os dados georreferenciados das coletas de amostras ambientais coletadas no Planalto das Agulhas Negras, em Itatiaia, RJ, das quais as linhagens de fungos filamentosos foram previamente isoladas, estão descritas na Tabela V.

*Tabela V: Relação das amostras de solo e serrapilheira coletadas no Planalto das Agulhas Negras, Parque Nacional de Itatiaia, correlacionando altitude e dados de geo-referenciamento.*

Amostras	Tipo	Quantidade de Isolados Fúngicos	Altitude (m)	Dados GPS	
				S	W
6	Solo	3	2.430	22.225984°	44.417692°
7	Solo	6	2.416	22.226432°	44.416873°
8	Serrapilheira	6	2.413	22.228679°	44.412488°
9	Solo	20	2.415	22.383948°	44.684075°
10	Serrapilheira	10	2.410	22.384923°	44.676503°
11	Solo	6	2.430	22.382950°	44.666993°
12	Solo	6	2.440	22.382500°	44.666457°
13	Solo	12	2.440	22.384678°	44.673482°

## V.2 Isolamento dos Micro-organismos

As amostras de solo e de serapilheira coletadas foram diluídas em solução fisiológica estéril e a técnica da diluição seriada foi adotada para o isolamento dos fungos filamentosos. Alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas, em triplicata, em meio seletivo suplementado com antibiótico penicilina (100 mg/L). Após o crescimento, os fungos foram purificados em meio de Ágar Malte (pH 5,5) através da técnica de esgotamento e repiques sucessivos. Após constatação da pureza da cultura, estas foram conservadas em água estéril pelo Método de Castelani a 10°C (CASTELANI, 1939).

## V.3 Identificação dos Fungos em Nível de Gênero

As linhagens de fungos filamentosos foram mantidos crescidos em meio Agar Malte (pH 5.5) a 28°C por 10 dias e então identificados utilizando análise macro e microscópica das estruturas de reprodução no seu estado anamórfico. As estruturas foram observadas com auxílio de microscópio óptico (Nikon Eclipse E-200), utilizando lentes objetivas apocromáticas de 10x e 40x.

## V.4 Avaliação Qualitativa da Descoloração dos Corantes em Meio Sólido

As linhagens de fungos filamentosos foram inicialmente cultivadas em meio Ágar Malte (28°C / 10 dias) e seu potencial em degradar corantes têxteis e não-têxteis foi avaliado. 1Slot (quadrado) foi recortado da borda da colônia do fungo ( $\cong 5 \text{ mm}^2$ ) e foi inoculados em meio Ágar Malte (20,0 g de extrato de malte; 5,0 g de glucose; 18,0 g de ágar; 1.000 mL de água destilada), suplementado com os corantes, individualmente, em 2 concentrações (100 e 200 ppm). Os corantes testados inicialmente no presente trabalho foram: *RBBR* (Sigma®), *RB-5* (Sigma®) e Rosa Bengala (Isofar®).

As placas foram então incubadas a 28°C por 14 dias, e a descoloração do meio observada visualmente ao fim de 7 e 14 dias de incubação. Placas contendo os corantes sem inóculo foram utilizadas como controle negativo e incubadas nas mesmas condições (28°C / 14 dias). A

capacidade de degradação dos corantes foi avaliada através da medição de zonas com descoloração circunscrevendo o crescimento fúngico.

### V.5 Fermentação Submersa

Para analisar a possibilidade de utilização das linhagens fúngicas na degradação de efluentes da indústria têxtil, os fungos considerados promissores no teste qualitativo em meio sólido foram selecionados para avaliação quantitativa dos percentuais de degradação de corantes por sistema submerso.

Neste estudo, os fungos selecionados foram crescidos em meio Ágar Malte (pH 5.5) a 28°C por 10 dias e então 3 *slots* da borda da colônia do fungo ( $\cong 5 \text{ mm}^2$ ) foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L contendo 400mL de meio de Extrato de Malte Modificado (12,5 g/L de extrato de malte; 0,06g/L de sulfato ferroso; 0,06g/L de sulfato de zinco; 0,06 g/L de sulfato de cobre; 0,2 g/L de corante; 1000 mL de água destilada). Os corantes utilizados no sistema submerso em 200ppm foram: *RB-5* (corante reativo), *RR-120* (corante reativo) e *DY-27* (corante direto).

O corante RB-5 foi utilizado como referência comparativa entre a fermentação submersa e a fermentação em meio sólido. Um segundo corante reativo, o RR-120, ainda não testado, foi utilizado de modo que pudesse ser realizada uma comparação com os outros corantes reativos (RB-5 e RBBR), testados previamente em meio sólido. O corante DY-27 foi testado para verificar se as linhagens fúngicas selecionadas previamente como promissoras, também seriam capazes em degradar um corante direto. O corante Rosa Bengala foi descontinuado, já que ele não possui amplo emprego na indústria têxtil.

O comprimento de onda (nm) de máxima absorbância foi determinado para cada corante no meio de cultura. Além disso, foram realizados experimentos com diversas concentrações dos corantes testados, de modo a verificar a aplicabilidade da Lei de Lambert-Beer para o comprimento de onda de máxima absorbância de cada corante na concentração utilizada.

A elaboração de uma equação de Lambert-Beer para a avaliação da redução da concentração dos corantes testados se deve ao fato de que esta relação leva em consideração as

interações intermoleculares presentes no meio líquido em questão – permitindo assim a determinação da concentração dos corantes durante a fermentação (WERNER MÄNTELE & ERHAN DENIZ, 2017). Assim, essa relação é mais precisa para se determinar experimentalmente a concentração de compostos cromóforos do que a simples avaliação do % de descoloração do corante, o que é realizado habitualmente em trabalhos que envolvem a degradação de corantes industriais (HADIBARATA et al., 2013).

A absorvância observada no meio modificado com os respectivos corantes na concentração de 200ppm foi tomada como o branco das análises e o espectro de onda foi medido para 7 e 14 dias de fermentação submersa através da retirada de alíquotas de 5mL do meio fermentado.

#### **V.6 Espectro dos Corantes e Relação de Lambert-Beer**

Todos os espectros de todos os corantes testados na fermentação submersa tiveram os seus comprimentos de onda medidos no intervalo de 200nm a 1000nm, sendo medidos a cada 2nm, no espectrofotômetro Shimadzu UV 1800. As medições foram realizadas em duplicata para cada concentração e a média aritmética das duplicatas foi utilizada como o valor experimental. Para cada corante, a fermentação foi realizada em triplicata para cada linhagem fúngica testada. O espectro do meio sem nenhum corante também foi analisado para que o mesmo possa ser utilizado como branco, para as fermentações submersa. Como não há interesse na aplicação da Lei de Lambert-Beer para o meio sem corante, a mesma não será gerada.

#### **V.7 Degradação do Corante por Meio Fermentado**

Para uma análise comparativa entre a fermentação submersa com as linhagens promissoras na presença dos diferentes corantes e uma fermentação na ausência dos corantes, foi elaborada uma nova metodologia de análise. Esta metodologia objetivou garantir que as linhagens promissoras não eram capazes de produzir substâncias cromóforas durante a fermentação submersa. Para cada corante analisado foi seguido o esquema exposto na Figura V-I:

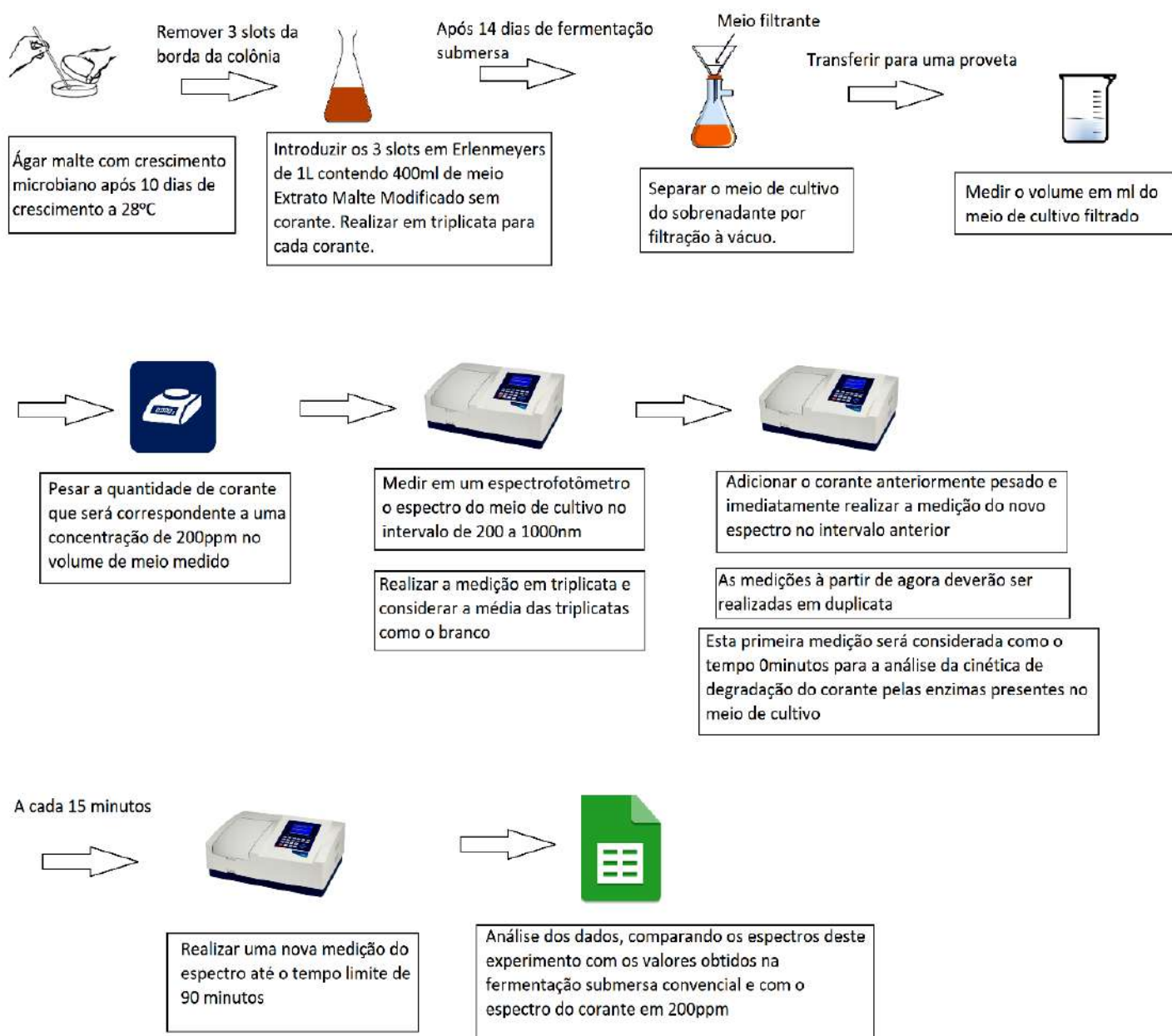


Figura V-1: Fluxograma da nova abordagem, meio fermentado.

## CAPÍTULO VI – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### VI.1 Isolamento dos Micro-organismos

O isolamento e a purificação dos micro-organismos obtidos à partir das amostras de solo e serrapilheira da floresta de Itatiaia foi realizado. No total foram isoladas 69 linhagens fúngicas e as respectivas identificações em nível de gênero foi realizadas, como demonstrado na Tabela VI.

Tabela VI: Relação das linhagens fúngicas isoladas.

<b>Linhagem</b>	<b>Gênero</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Gênero</b>
I13-1	N.I.	I9-3	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-1A	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-4	<i>Penicillium sp.</i>
I13-1B	<i>Penicillium sp.</i>	I9-5	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-3	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-6	N.I.
I13-4	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-7	<i>Penicillium sp.</i>
I13-5	<i>Penicillium sp.</i>	I9-8	<i>Dichobotrys sp.</i>
I13-6	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-9	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-7	<i>Penicillium sp.</i>	I9-10	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-8	<i>Botrytis sp.</i>	I9-11	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-9	<i>Botrytis sp.</i>	I9-12	<i>Trichoderma sp.</i>
I13-10	<i>Penicillium sp.</i>	I9-15	<i>Gliocardium sp.</i>
I13-11	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-16	<i>Arthobotrys sp.</i>
I12-1	<i>Penicillium sp.</i>	I9-17	<i>Trichoderma sp.</i>
I12-3	N.I.	I9-18	<i>Trichoderma sp.</i>
I12-4	<i>Penicillium sp.</i>	I9-19	<i>Trichoderma sp.</i>
I12-5	N.I.	I9-20	<i>Trichoderma sp.</i>
I12-6	<i>Penicillium sp.</i>	I9-21	N.I.
I12-7	<i>Penicillium sp.</i>	I9-22	<i>Phaecilomyces sp.</i>
I11-1	<i>Trichoderma sp.</i>	I9-23	N.I.
I11-2	<i>Mortiella sp.</i>	I9-24	N.I.
I11-3	<i>Trichoderma sp.</i>	IS8-1	<i>Gliocardium sp.</i>
I11-4	N.I.	IS8-2	<i>Trichoderma sp.</i>
I11-5	N.I.	IS8-3	<i>Curvularia sp.</i>
I11-6	<i>Aspergillus sp.</i>	IS8-4	N.I.
IS10-1	<i>Trichoderma sp.</i>	IS8-5	N.I.
IS10-2	<i>Blastomyces sp.</i>	IS8-6	<i>Fusarium sp.</i>
IS10-3	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-2	N.I.
IS10-5	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-3	<i>Penicillium sp.</i>
IS10-6	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-4	<i>Penicillium sp.</i>
IS10-7	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-5	<i>Penicillium sp.</i>
IS10-8	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-6	<i>Aspergillus sp.</i>
IS10-9	<i>Trichoderma sp.</i>	I7-7	<i>Penicillium sp.</i>
I9-1	<i>Botrytis sp.</i>	I6-1	<i>Phaecilomyces sp.</i>
I9-2	<i>Trichoderma sp.</i>	I6-2	<i>Penicillium sp.</i>
		I6-3	<i>Verticillium sp.</i>

N.I. – não identificado

## VI.2 Screening para Degradação de Corantes em Meio Sólido

A degradação dos corantes testados em meio sólido foi realizada de acordo com o descrito no item V.4. Na Tabela VII foram utilizados símbolos para facilitar a visualização e o entendimento das mesmas.

Tabela VII: Tabela com a degradação dos corantes (Rosa Bengala, RB-5 e RBBR) pelos fungos isolados após 7 e 14 dias de fermentação em meio sólido.

Gênero \ Dias	200 ppm						100 ppm					
	Rosa Bengala		RB-5		RBBR		Rosa Bengala		RB-5		RBBR	
	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
<b>I6-1</b> <i>Phaecilomyces sp.</i>	++	++	+	+	E	E	+	++	-	-	+	+
<b>I6-2</b> <i>Penicillium sp.</i>	++	++	-	+	+	++	++	++	+	+	-	+
<b>I6-3</b> <i>Verticillium sp.</i>	-	E	-	-	-	-	-	+	-	++	-	E
<b>I7-2</b> <i>N.I.</i>	E	E	+	+	+	+	E	++	+	+	++	++
<b>I7-3</b> <i>Penicillium sp.</i>	-	E	+	++	+++	+++	+	+++	-	-	E	++
<b>I7-4</b> <i>Penicillium sp.</i>	-	E	E	E	E	E	E	E	+	-	E	+
<b>I7-5</b> <i>Penicillium sp.</i>	-	E	-	E	-	+	-	++	-	-	-	E
<b>I7-6</b> <i>Aspergillus sp.</i>	-	+	-	E	+	+	-	+	-	-	+	++
<b>I7-7</b> <i>Penicillium sp.</i>	++	+	+	+	+	++	+	+++	-	-	+	++
<b>IS8-1</b> <i>Gliocadium sp.</i>	+	E	++	E	E	E	+	+	+	+	+	E
<b>IS8-2</b> <i>Trichoderma sp.</i>	E	E	+	+	E	E	E	E	E	+	E	E
<b>IS8-3</b> <i>Curvularia sp.</i>	+	+	+	+	E	E	+	++	-	+	+	+
<b>IS8-4</b> <i>N.I.</i>	-	E	+	+	E	E	-	E	E	++	++	++
<b>IS8-5</b> <i>N.I.</i>	E	E	+	E	-	E	E	E	E	+	+	E
<b>IS8-6</b> <i>Fusarium sp.</i>	E	E	++	+	E	E	+	+	E	-	+	+
<b>I9-1</b> <i>Botrytis sp.</i>	-	E	E	E	-	E	-	E	+	+++	E	E
<b>I9-2</b> <i>Trichoderma sp.</i>	+	++	+	E	+	+++	+	++	E	E	+	++
<b>I9-3</b> <i>Trichoderma sp.</i>	-	E	E	E	-	+	+	+	E	E	+	++
<b>I9-4</b> <i>Penicillium sp.</i>	-	+	+	++	+	+	-	-	-	++	+	+
<b>I9-5</b> <i>Trichoderma sp.</i>	-	E	+	+	-	-	-	E	+	+	-	E
<b>I9-6</b> <i>N.I.</i>	-	E	E	E	-	E	E	E	E	E	++	++
<b>I9-7</b> <i>Penicillium sp.</i>	E	E	++	++	E	E	-	E	++	+	+	+
<b>I9-8</b> <i>Dichobotrys sp.</i>	-	E	+	++	+	E	-	E	+	++	+	E
<b>I9-9</b> <i>Trichoderma sp.</i>	-	+	++	++	E	E	+	E	E	E	E	E
<b>I9-10</b> <i>Trichoderma sp.</i>	E	E	+	+	E	E	E	E	E	E	E	E
<b>I9-11</b> <i>Trichoderma sp.</i>	+	+++	+	E	E	E	E	E	-	+	+++	+++
<b>I9-12</b> <i>Trichoderma sp.</i>	E	E	E	+	E	E	E	E	+	E	+	-

Gênero \ Dias		100ppm						200ppm					
		Rosa Bengala		RB-5		RBBR		Rosa Bengala		RB-5		RBBR	
		7	14	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
<b>I9-15</b>	<i>Gliocadium sp.</i>	E	,	+	+	-	E	E	E	-	-	+	E
<b>I9-16</b>	<i>Arthobotrys sp.</i>	E	+	+	++	-	-	E	-	E	++	+	++
<b>I9-17</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	E	E	+	+	-	E	-	E	E	E	+	-
<b>I9-18</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	E	E	+	+	E	E	-	+	E	E	++	++
<b>I9-19</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	-	+	++
<b>I9-20</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	E	E	E	+	E	E	+	E	+	E	+	+
<b>I9-21</b>	<i>N.I.</i>	E	E	E	+	E	E	E	E	E	E	-	E
<b>I9-22</b>	<i>Phaecilomyces sp.</i>	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>I9-23</b>	<i>N.I.</i>	-	E	+	E	+	E	-	E	E	E	E	E
<b>I9-24</b>	<i>N.I.</i>	E	E	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+++
IS10-1	<i>Trichoderma sp.</i>	+	++	+	+	-	-	+	+	+	++	+	++
IS10-2	<i>Blastomyces sp.</i>	-	E	+	++	-	+	+	E	+	E	+	+
IS10-3	<i>Trichoderma sp.</i>	+	++	+	+	-	-	+	++	+	+	+	E
IS10-5	<i>Trichoderma sp.</i>	+	+	+	+	-	E	-	++	+	E	+	++
IS10-6	<i>Trichoderma sp.</i>	-	E	+	+	-	-	-	+	+	+	+	++
IS10-7	<i>Trichoderma sp.</i>	+	+++	+	+	-	+	+	+	+	E	+	+
IS10-8	<i>Trichoderma sp.</i>	++	E	+++	+++	E	E	+++	++	E	E	++	++
IS10-9	<i>Trichoderma sp.</i>	+	+	+	+	E	E	-	+	E	E	+	+
I11-1	<i>Trichoderma sp.</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	E	-	-
<b>I11-2</b>	<i>Mortiella sp.</i>	E	E	++	++	+	++	E	E	++	++	++	+++
<b>I11-3</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	++	+++	E	+	-	++	++	++	++	++	-	+
<b>I11-4</b>	<i>N.I.</i>	E	E	E	+	-	E	E	E	+	E	-	E
<b>I11-5</b>	<i>N.I.</i>	+	+	+	+	E	E	+	E	-	+	+	E
<b>I11-6</b>	<i>Aspergillus sp.</i>	E	E	+	+	E	E	+	++	-	-	E	E
I12-1	<i>Penicillium sp.</i>	-	E	-	E	-	+	-	+	E	E	-	E
<b>I12-3</b>	<i>N.I.</i>	E	E	E	E	E	E	E	++	+	+	E	E
<b>I12-4</b>	<i>Penicillium sp.</i>	-	E	+	+	E	E	-	E	-	++	+	E
<b>I12-5</b>	<i>N.I.</i>	+	+	++	+	E	E	++	++	E	-	E	+
<b>I12-6</b>	<i>Penicillium sp.</i>	E	E	++	++	+	+	E	++	-	-	+	++
<b>I12-7</b>	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	++	++	-	E	+	++	+	++	-	+
I13-1	<i>Penicillium sp.</i>	-	E	-	+	-	-	-	E	-	E	+	++
<b>I13-1A</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	+++	+	+	-	-	+	++	+	+	+	E
<b>I13-1B</b>	<i>Penicillium sp.</i>	++	+++	+	+	-	+	+	++	+	+	+	E
<b>I13-3</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	++	+++	+	++	+	+	+	++	+	E	+	+
<b>I13-4</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	+++	+	+	+	+	-	++	+	+	+	E
<b>I13-5</b>	<i>Penicillium sp.</i>	+	++	+	++	-	-	++	+++	-	E	-	-
<b>I13-6</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	++	++	-	-	-	-	+	++	-	E	+	E



Gênero \ Dias	100ppm						200ppm					
	Rosa Bengala		RB-5		RBBR		Rosa Bengala		RB-5		RBBR	
	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
<b>I13-7</b> <i>Penicillium</i> sp.	++	++	+	++	+	+++	++	++	++	+	+	+++
<b>I13-8</b> <i>Botrytis</i> sp.	-	E	+	+	-	-	-	E	+	+	-	-
<b>I13-9</b> <i>Botrytis</i> sp.	+	E	+	+	+	+	+	E	+	+	+	+
<b>I13-10</b> <i>Penicillium</i> sp.	+	++	-	-	-	-	++	+++	-	-	-	E
<b>I13-11</b> <i>Trichoderma</i> sp.	++	++	+	+	+	+	E	++	+	E	+	+

*N.I.* – não identificado; (-) ausência de degradação do corante; (+) fraca degradação do corante; (++) média degradação transparência; (+++) forte degradação do corante; (E) escurecimento do meio sólido

Foi considerada uma fraca e média degradação o clareamento da placa perceptível a olho nu, porém que não alcançou a transparência. Já uma forte degradação do corante foi identificada como a degradação do corante que alcançava a transparência da placa.

As concentrações de 100 e 200 ppm foram selecionadas já que a maioria das pesquisas utiliza concentrações entre 25 ppm e 200 ppm, assim 100 e 200 ppm seriam consideradas concentrações médias e altas (BONUGLI-SANTOS, 2010; MIQUELANTE, 2011; TORRES *et al.*, 2011).

As linhagens I13-7, *Penicillium* sp.; I11-2, *Mortierella* sp., e I9-11, *Trichoderma* sp. e I9-24, *N.I.* promoveram uma elevada degradação do corante RBBR na concentração de 100 ppm. Dentre essas linhagens se destaca a linhagem I9-11 que promoveu uma elevada degradação a partir de 7 dias de fermentação em estado sólido.

Já as linhagens I13-7, *Penicillium* sp.; I9-2, *Trichoderma* sp., e I7-3, *Penicillium* sp., promoveram uma elevada degradação do corante RBBR na concentração de 200 ppm. Dentre essas linhagens se destaca a linhagem I7-3 que promoveu uma elevada degradação a partir de 7 dias de fermentação em estado sólido. Destacou-se também, a linhagem I13-7, *Penicillium* sp., já que esta apresentou uma elevada degradação do corante em ambas as concentrações de RBBR.

Somente a linhagem I9-1, *Botrytis* sp., promoveu uma elevada degradação do corante RB-5 na concentração de 100 ppm. Isto provavelmente se deve a elevada complexidade do corante quando comparado aos corantes RBBR e Rosa Bengala.

Somente a linhagem I10-8, *Trichoderma sp.*, apresentou uma elevada degradação do corante RB-5 na concentração de 200 ppm. Essa linhagem demonstrou em 7 dias de fermentação em meio sólido um clareamento da placa até a transparência, indicando uma alta possibilidade de utilização dessa linhagem para a degradação do corante RB-5 quando o mesmo se apresenta em elevadas concentrações. Nenhuma linhagem fúngica apresentou uma elevada degradação do corante RB-5 em ambas as concentrações.

As linhagens I13-5 e I13-10 ambas pertencentes ao gênero *Penicillium sp.* foram boas degradadoras do corante Rosa Bengala na concentração de 100 ppm, conforme Figura VI-I. Outras 3 linhagens também degradaram bem o corante Rosa Bengala em 100ppm, porém não foram tão boas quanto as anteriormente citadas.

A degradação dos corantes pode ser devido à produção de enzimas extracelulares secretadas pelos fungos que permitem que os mesmos degradem compostos complexos, transformando-os em alimento (TORRES *et al.*, 2011), ou devido à adsorção com posterior oxidação dos compostos dentro da célula. Logo, o que está acontecendo quando a placa se torna transparente é que a estrutura cromófora do corante – responsável pela coloração – está sendo quebrada em substâncias menos complexas sem propriedades de absorção de luz visível. Algumas dentre estas linhagens promoveram a absorção e bioacumulação dos corantes em suas estruturas, como a linhagem I13-5 que aparece na Figura VI-I (MIQUELANTE, 2011), mas como este não é o foco deste trabalho, estes fungos não prosseguiram para a fermentação submersa.



Figura VI-I: Degradação das linhagens I13-10 e I13-5 para o corante Rosa Bengala em 100ppm.

Já as linhagens I13-1A, *Trichoderma* sp., I13-1B, *Penicillium* sp., I13-3, *Trichoderma* sp., I13-4, *Trichoderma* sp., I11-3, *Trichoderma* sp., I10-7, *Trichoderma* sp., e I9-11, *Trichoderma* sp., foram boas degradadoras do corante Rosa Bengala em meio sólido na concentração de 200 ppm. Abaixo, na Figura VI-II, se encontram fotos das linhagens mais eficientes em 200 ppm para o rosa bengala.



Figura VI-II: Fotos da degradação em estado sólido do corante Rosa Bengala em 200ppm para algumas linhagens.

Nenhuma linhagem fúngica apresentou uma elevada degradação do corante Rosa Bengala em ambas as concentrações. As fotos dos fungos que foram os melhores na fermentação em estado sólido para cada um dos corantes testados se encontram abaixo na Figura VI-III.

Uma observação interessante é que uma boa parcela das linhagens fúngicas que degradaram bem os corantes na concentração de 200ppm, por muitas vezes não realizaram uma boa degradação do corante na concentração de 100ppm. Isto indica que embora em um meio contendo uma maior quantidade de corante – que deveria ser mais tóxico – o efeito de aumento de concentração provavelmente promove a indução da produção de uma maior quantidade de enzimas extracelulares pelos fungos filamentosos em questão (TRELLA *et al.*, 2006). Este aumento de produção das enzimas deve ter sido o suficiente para que os corantes presentes no meio tivessem sido transformados em espécies químicas com menor absorção de luz no espectro visível.

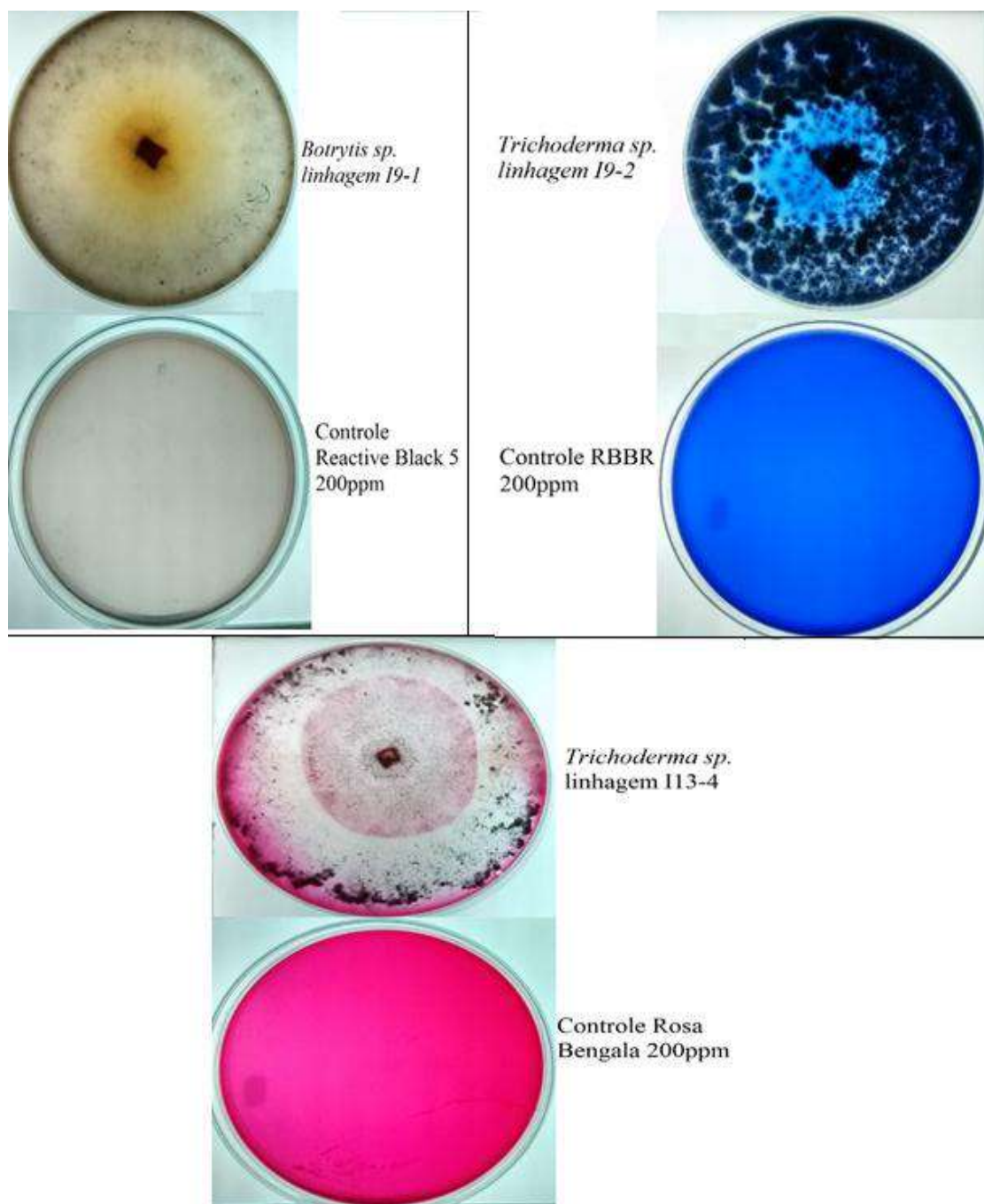


Figura VI-III: Fotos dos melhores fungos na fermentação em estado sólido para cada um dos corantes testados.

### VI.3 Espectro dos Corantes e Lei de Lambert-Beer

#### Espectro do meio de cultura sem adição de corante

O espectro do meio sem nenhum corante foi analisado, para que o mesmo possa ser utilizado como branco para as fermentações em submerso (Figura VI-IV). Como não há interesse na produção de uma Lei de Lambert-Beer para o meio sem corante, a mesma não será gerada.

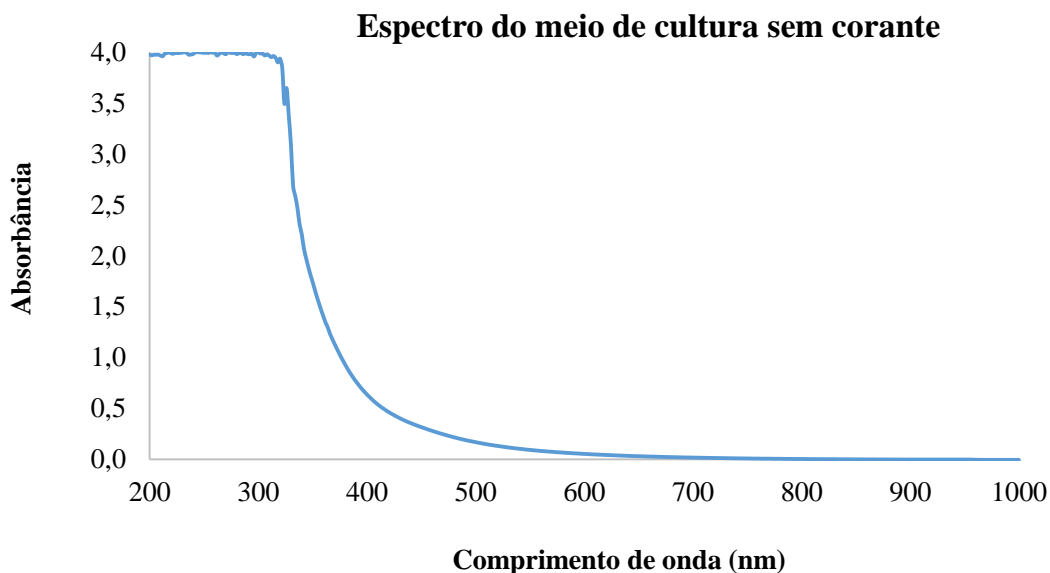


Figura VI-IV: Espectro de absorvância do meio de cultura sem corante (branco).

O espectro do meio de cultura sem diluição servirá como branco para o espectro dos corantes colocados no meio de cultura, removendo assim a influência da coloração do meio nos espectros dos corantes em questão.

#### Espectro do Corante RB-5 e Lei de Lambert-Beer

Para o corante RB-5 foi gerado um espectro de absorvância no intervalo de 200nm a 1000nm para o meio de cultura contendo diversas concentrações do corante, conforme Figura VI-V:

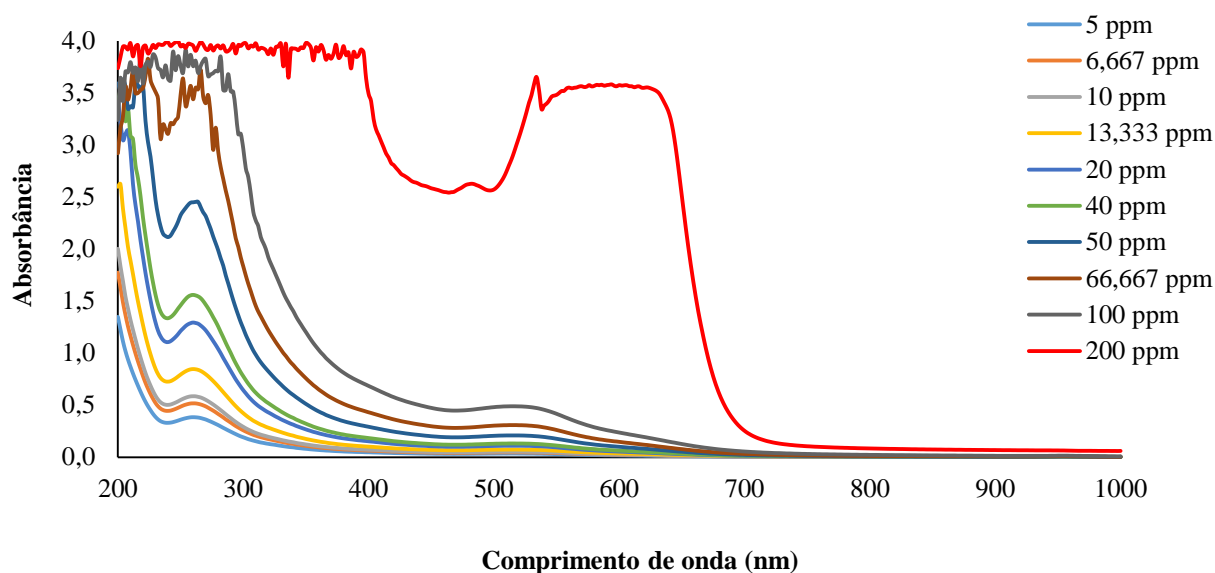


Figura VI-V: Espectro de absorvância do corante RB-5 no meio de cultura.

Para o corante RB-5 foi estabelecido o comprimento de onda de 534nm como o comprimento de onda máximo de absorção, após a remoção do branco – meio de cultura sem o corante. De acordo com os dados experimentais obtidos, através de diversas diluições do corante em questão no meio de cultura, obteve-se a seguinte curva de Absorbância x Concentração em ppm que é mostrada abaixo.

A partir dos dados, com a remoção do branco, obteve-se a equação:  $\text{Absorbância} = 0,047 * \text{concentração em ppm} + 0,0106$  (válida de 5ppm até 100ppm). A precisão dessa equação é de 99,78%, conforme a Figura VI-VI.

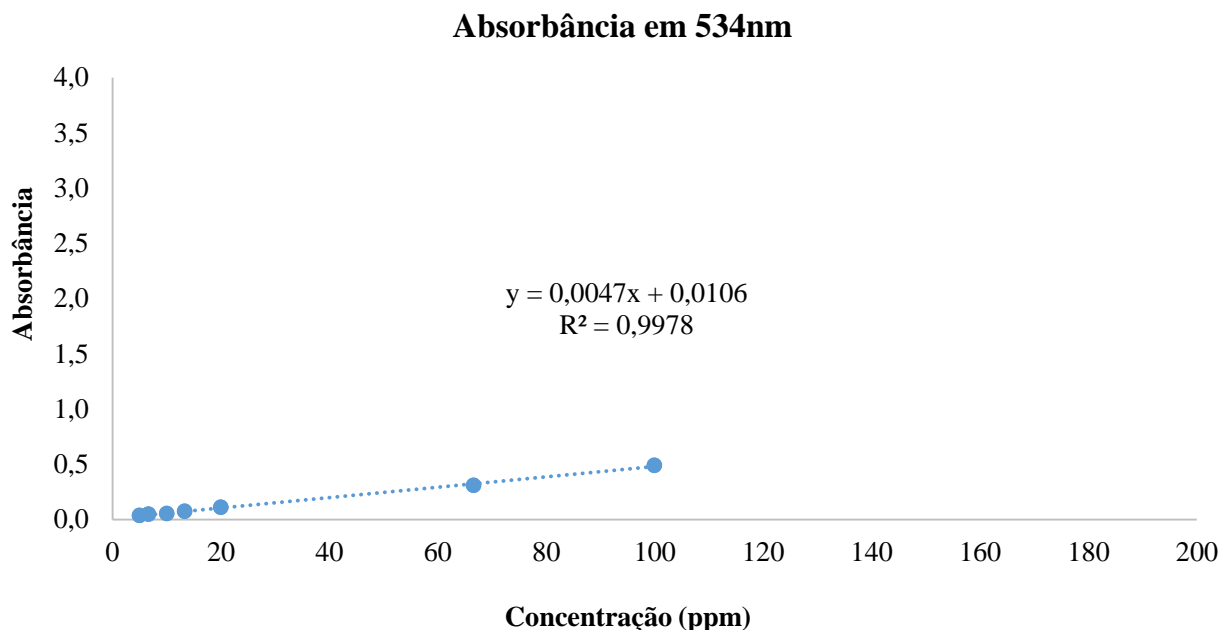


Figura VI-VI: Lei de Lambert-Beer para o corante RB-5 em 534nm (válida de 5 a 100ppm).

A curva de absorbância x concentração se mostrou linear até a concentração de 100ppm, após esta concentração ocorre um drástico aumento da absorbância que deveria ser aproximado por uma curva exponencial, mas como o objetivo do trabalho se atém à elaboração de uma Lei de Lambert-Beer, geraremos esta expressão para o intervalo de 5 a 100ppm. O grande aumento da absorbância após 100ppm pode ser devido ao fato do corante apresentar uma forte coloração, que aumenta drasticamente a absorbância após uma certa concentração.

### **Espectro do Corante RR-120 e Lei de Lambert-Beer**

Para o corante RR-120 foi gerado um espectro de absorbância no intervalo de 200nm a 1000nm para o meio de cultura contendo diversas concentrações do corante, conforme Figura VI-VII:



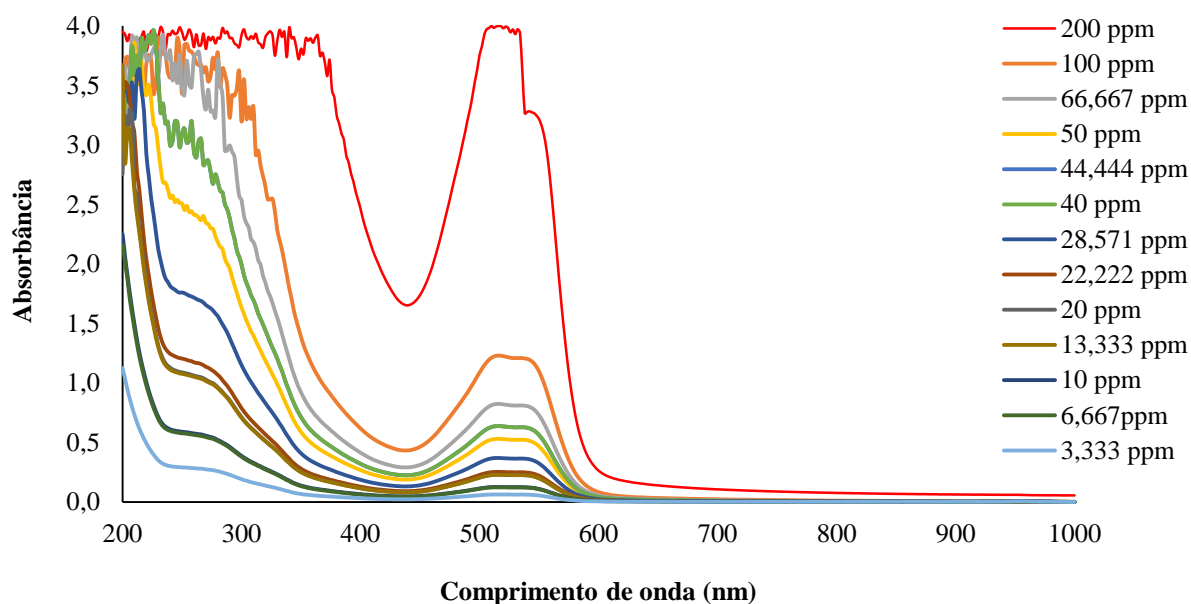


Figura VI-VII: Espectro de absorvância do corante RR-120 no meio de cultura.

Para o corante RR-120 foi estabelecido o comprimento de onda de 518nm como o comprimento de onda máximo de absorção. De acordo com os dados experimentais obtidos através de diversas diluições do corante em questão, com a retirada do branco, obteve-se a seguinte curva de Absorbância x Concentração em ppm que é mostrada abaixo. A partir dos dados obteve-se a Lei de Lambert-Beer:  $\text{Absorbância} = 0,019 \times \text{Concentração em ppm} - 0,1752$  (válida de 3ppm até 200ppm). A precisão dessa equação é de 95,3%, conforme Figura VI-VIII.

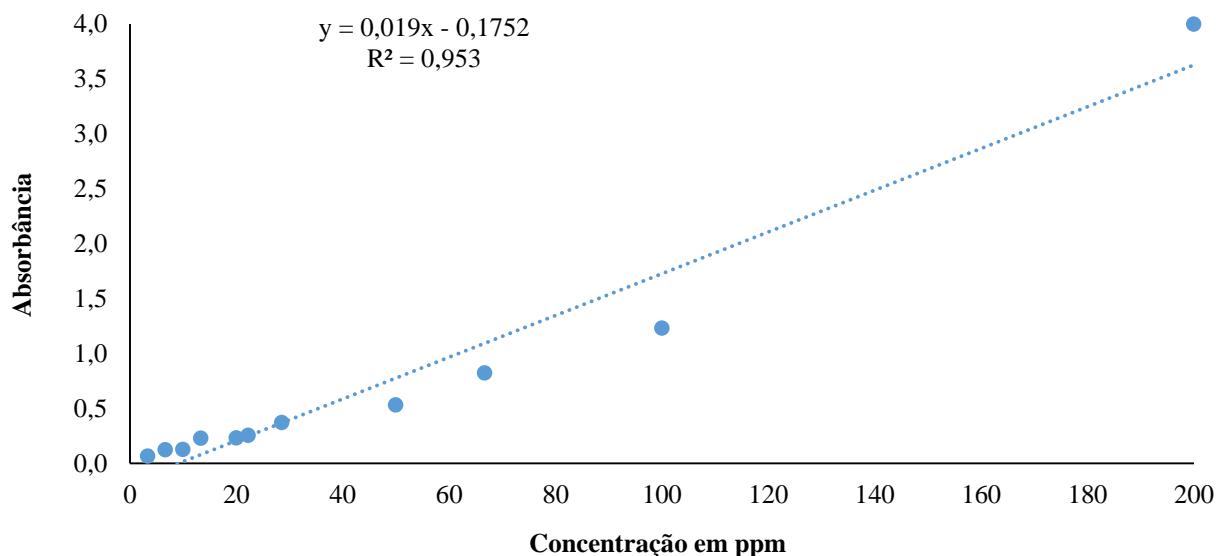


Figura VI-VIII: Lei de Lambert-Beer para o corante RR-120 em 518nm (válida de 3 a 200ppm).

Esta relação de Lambert-Beer é uma aproximação para o intervalo de referência entre 0 e 200ppm. Apesar da curva não apresentar um comportamento perfeitamente linear, a precisão de 95,3% é suficientemente alta para poder-se aproximar os valores neste intervalo em questão. Isto pode ser devido à uma coloração elevada do corante em questão, mas que ainda assim não é tão intensa quanto a do corante RB-5.

### Espectro do Corante DY-27 e Lei de Lambert-Beer

Para o corante DY-27 foi gerado um espectro de absorbância no intervalo de 200nm a 1000nm para o meio de cultura contendo diversas concentrações do corante. Neste corante o comprimento de onda de máxima absorção se encontra em 400 nm. De acordo com os dados experimentais obtidos através de diversas diluições do corante em questão, obteve-se a seguinte curva de Absorbância x Concentração em ppm que é mostrada abaixo na Figura VI-IX.

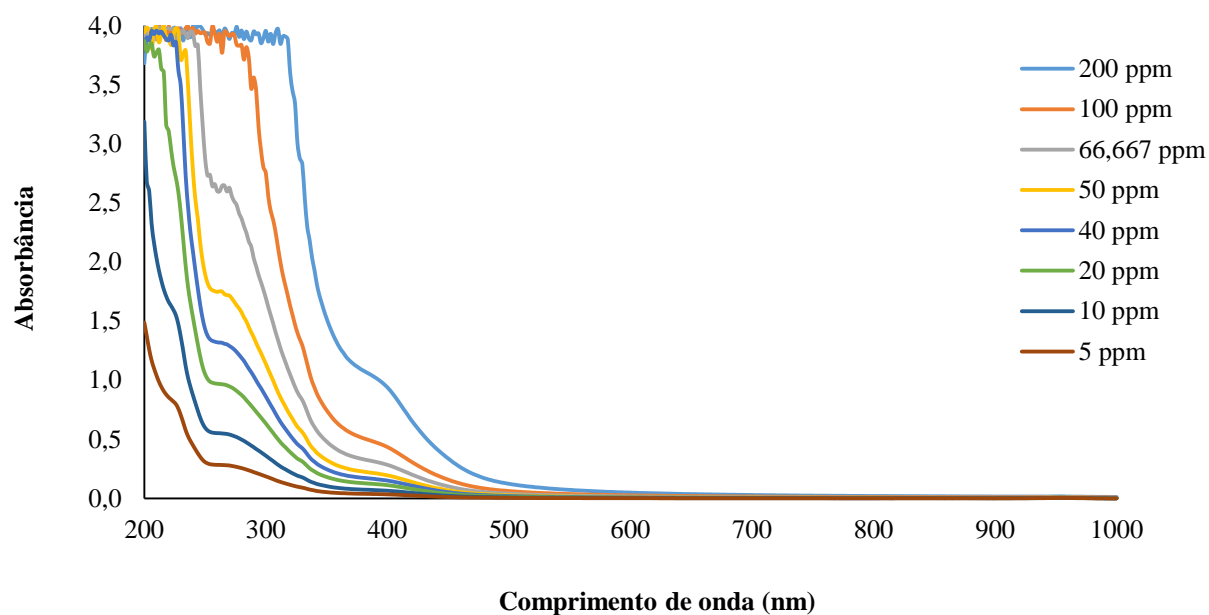


Figura VI-IX: Espectro de absorvância do corante DY-27 no meio de cultura.

A partir dos dados sem o branco obteve-se a equação: Absorvância =  $0,0046 \times$  Concentração em ppm -  $0,0063$  (válida de 3 ppm até 200 ppm). A precisão dessa equação é de 99,28%, conforme Figura VI-X.

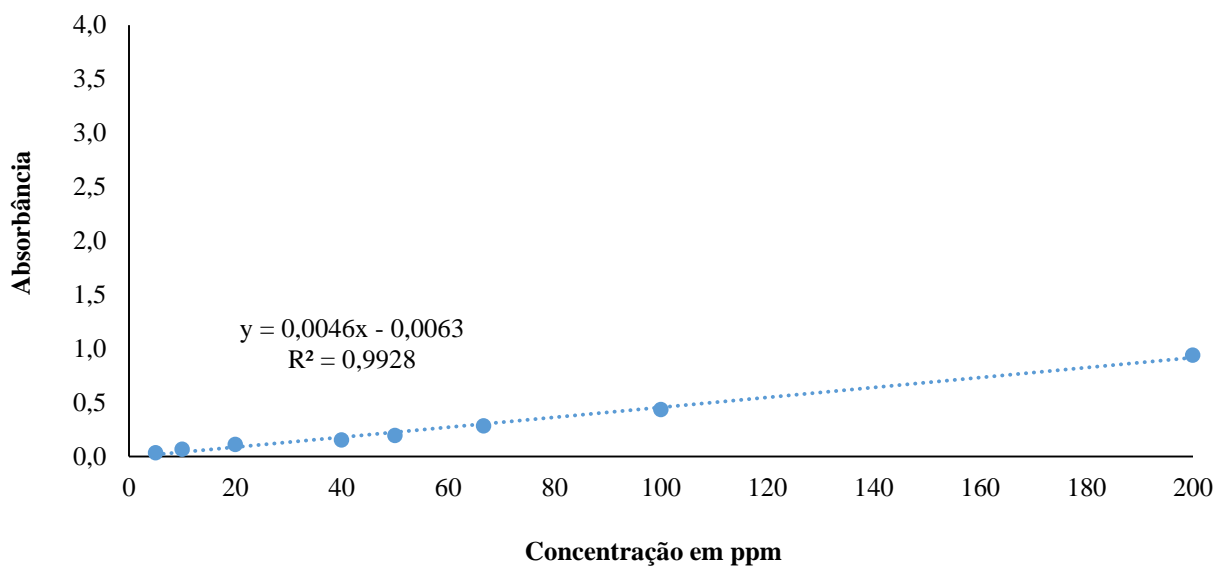


Figura VI-X: Lei de Lambert-Beer para o corante DY-27 em 400 nm (válida de 3 a 200 ppm).

Para este corante não há um significativo desvio na Relação de Lambert-Beer, isto provavelmente se deve à estrutura do corante – já que este é um corante direto cuja coloração não é tão acentuada quanto os demais corantes testados.

#### VI.4 Fermentação Submersa da linhagem *Trichoderma* sp. I10-8

A linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 mostrou ser promissora para a degradação do corante RB-5 através do *screening* em placa de Petri assim, ela selecionada para a fermentação submersa.

##### VI.4.1 RB-5

Os valores obtidos na fermentação submersa da linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 utilizando o corante RB-5 (concentração de 200 ppm) após 7 e 14 dias de fermentação se encontram na Figura VI-XI. A curva do corante RB-5 na concentração de 200 ppm foi explicitada para melhor comparação dos dados.

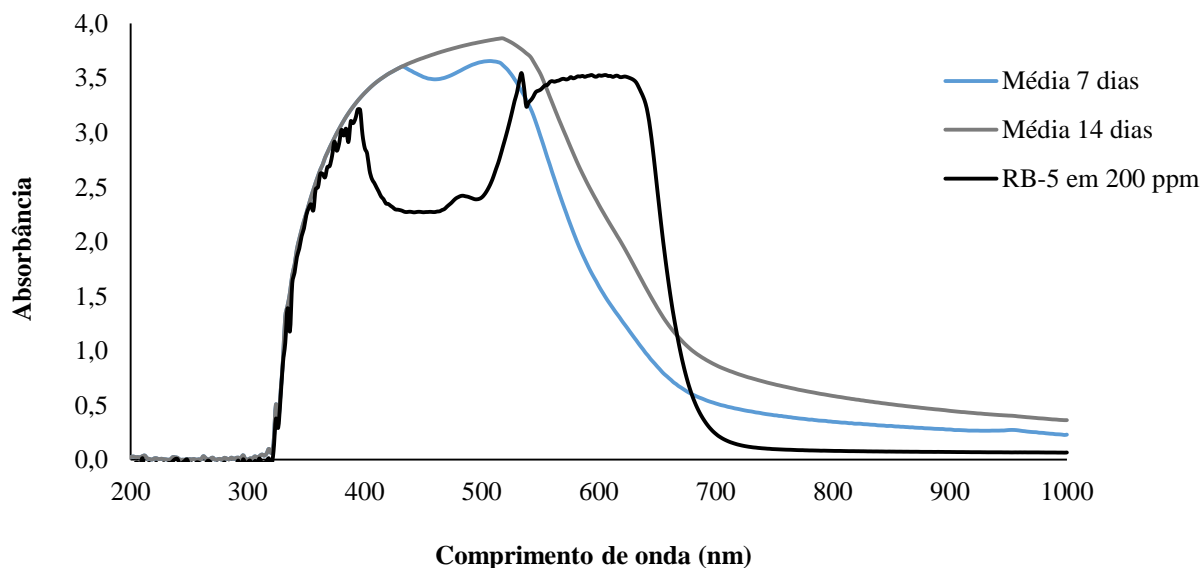


Figura VI-XI: Fermentação submersa pela linhagem *Trichoderma* sp. linhagem I10-8 do corante RB-5 com a retirada do branco.

Foi verificado que em 7 dias de fermentação submersa a linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 promoveu um escurecimento do meio de cultura entre 392 e 530nm e nos comprimentos de onda acima de 680nm. Em 14 dias de fermentação submersa este fato tornou-se ainda mais acentuado, fazendo com que ao final dos 14 dias do experimento não ocorresse uma redução da absorbância no comprimento de onda de máxima absorbância. Isto pode ser devido a uma transformação do corante RB-5 em um intermediário com maior absorbância nessas faixas em questão (WANG *et al.*, 2003), que seria possivelmente mais tóxico que o próprio RB-5 segundo Wang ou poderia ser uma função da produção de pigmentos pela linhagem fúngica como a produção de melanina por exemplo (EISENMAN & CASADEVALL, 2012).

#### VI.4.2 RR-120

Os valores obtidos na fermentação submersa da linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 utilizando o corante RR-120 em 200ppm, se encontram no gráfico abaixo. A curva do corante RR-120 foi explicitada para melhor comparação dos dados na Figura VI-XII.

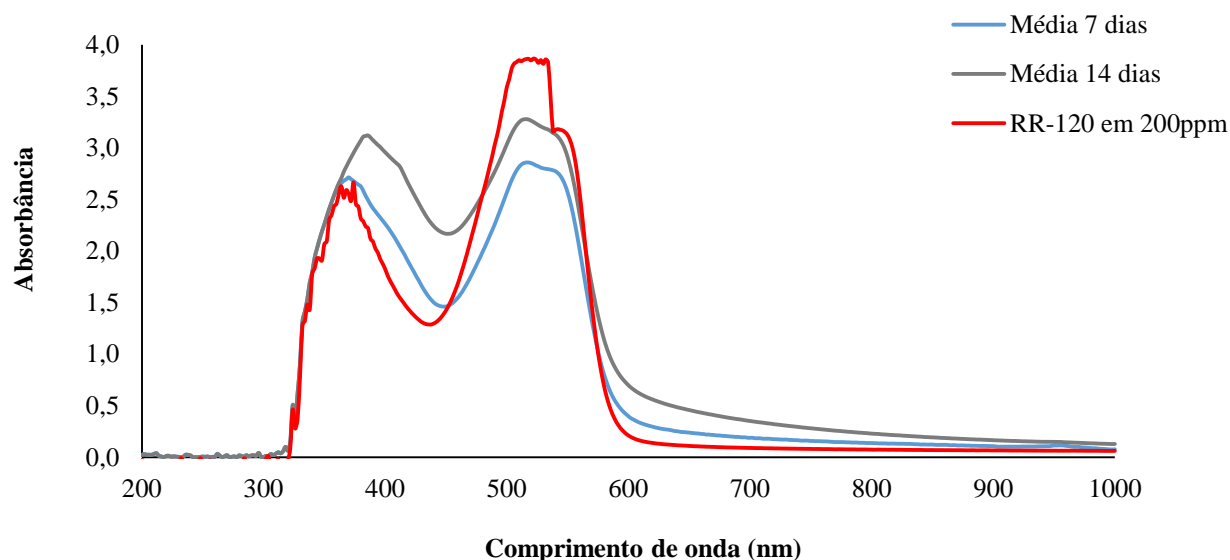


Figura VI-XII: Fermentação submersa pela linhagem *Trichoderma* sp. linhagem I10-8 do corante RR-120 com a retirada do branco

Após 7 dias de fermentação submersa a linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 promoveu uma sensível redução da coloração do corante RR-120. Contudo, assim como ocorreu com o corante RB-5, quando a fermentação continuou até 14 dias de fermentação em submerso ocorreu um acréscimo da absorbância em todos os comprimentos de onda. Ainda assim, a absorbância no comprimento de onda de máxima absorção ainda foi menor do que inicialmente e a redução da absorbância em 518nm pode ser aferida na Figura VI-XIII abaixo.

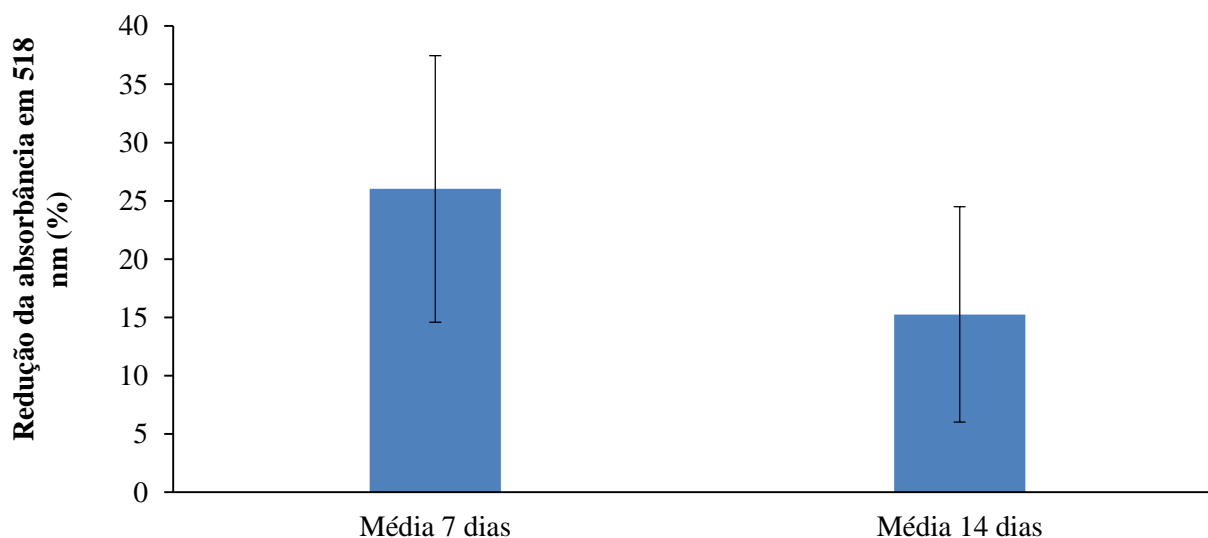


Figura VI-XIII: Redução da absorbância em 518nm para o corante RR-120 após fermentação submersa pela linhagem *Trichoderma* sp. I10-8.

Segundo a Lei de Lambert-Beer estabelecida para o corante RR-120, a concentração final do corante após 7 dias de fermentação foi de 159,6ppm e após 14 dias de fermentação seria de 181,5 ppm, tomando como valor a média das absorbâncias das três amostras. Isto indica que teria ocorrido a degradação de 20,2% após 7 dias de fermentação submersa enquanto haveria a degradação de 9,2% do corante inicialmente adicionado ao meio de cultura ao final de 14 dias de fermentação submersa.

Embora estes dados possam parecer estranhos, já que ocorre um acréscimo da absorbância com o decorrer da fermentação submersa, eles são explicados por Zhang e colaboradores (2007), já que: “Na análise de HPLC o corante original não foi detectado ... de fato, a coloração vermelha aparente na solução com o corante se deve à formação de novos

corantes formados à partir da degradação do RR-120, com o grupo azo mantendo a absorbância em 535nm”(tradução à mão livre).

Uma proposta de degradação do corante RR-120 (Figura VI-XIV) apresentada por Velmurugan & Swaminathan através de uma análise GC-MS expõe que os intermediários gerados seriam os expostos na Figura VI-XIV.

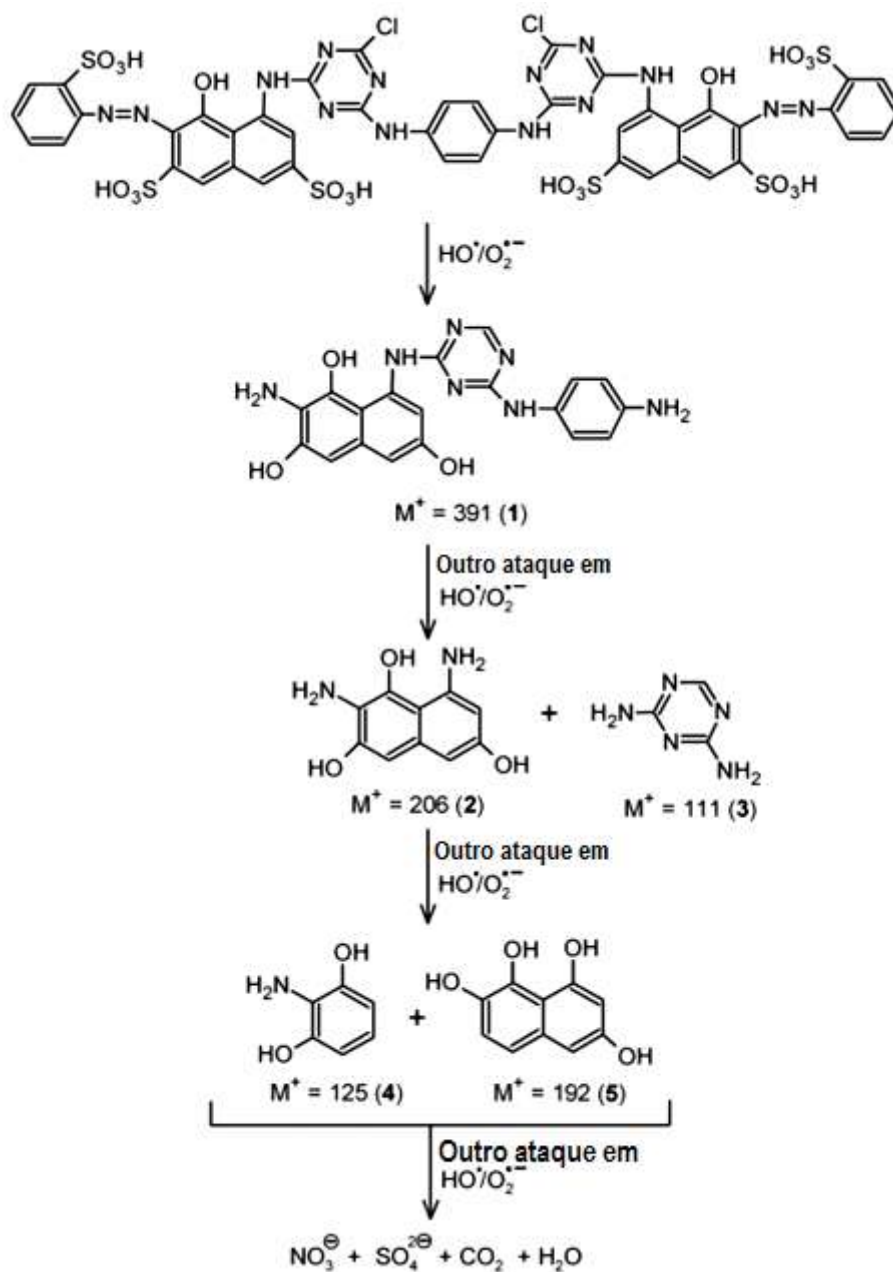


Figura VI-XIV: Proposta de degradação do corante RR-120 utilizando cristais de ZnO. (VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011)



### VI.4.3 DY-27

Os valores obtidos na fermentação submersa da linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 utilizando o corante RR-120 em 200ppm, se encontram no gráfico a seguir. A curva do corante RR-120 foi explicitada para melhor comparação dos dados na Figura VI-XV.

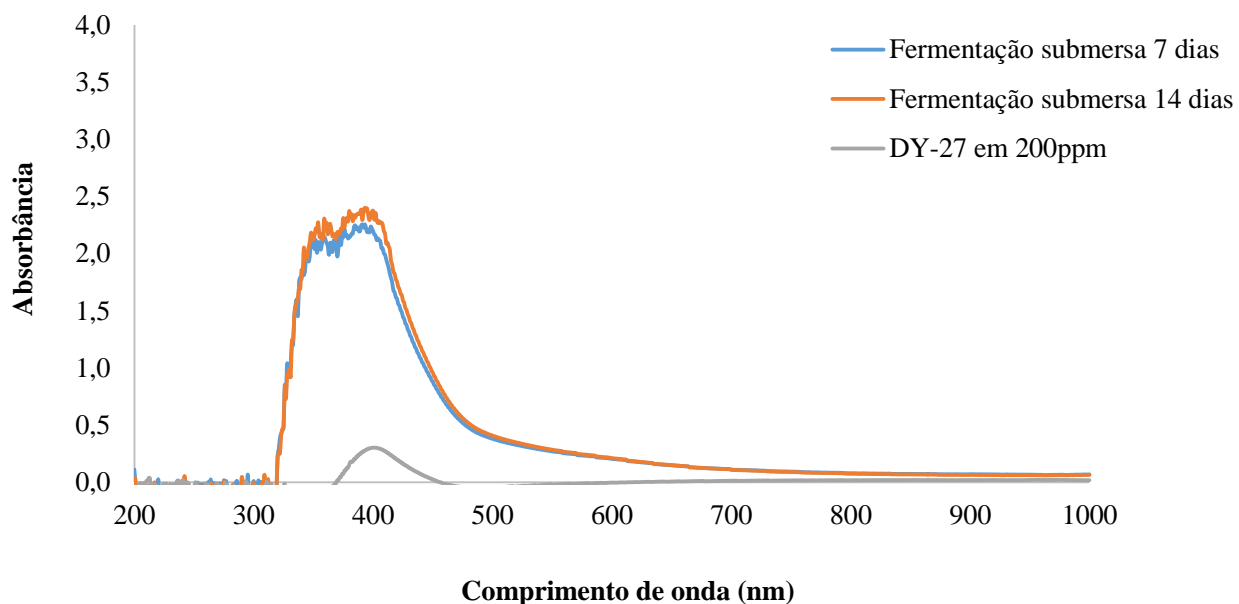


Figura VI-XV: Fermentação submersa pela linhagem *Trichoderma* sp. linhagem I10-8 do corante DY-27 com a retirada do branco.

Verificou-se que em 7 dias de fermentação submersa a linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 promoveu um escurecimento do meio de cultura em todos os comprimentos de onda acima de 300nm. Em 14 dias de fermentação submersa este fato permaneceu, havendo um ligeiro aumento de absorbância, fazendo com que ao final dos 14 dias do experimento não ocorresse uma redução da absorbância no comprimento de onda de máxima absorbância. Isto pode ser devido a uma transformação do corante DY-27 em um intermediário com maior absorbância nessas faixas em questão (WANG *et al.*, 2003), ou poderia ser uma função da produção de pigmentos pela linhagem fúngica como a produção de melanina por exemplo (EISENMAN & CASADEVALL, 2012).

#### **VI.4.4 Discussão**

A linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 se mostrou relevante para o prosseguimento da pesquisa, após os testes em estado sólido, contudo a avaliação real do seu desempenho em fermentação submersa foi comprometida devido à geração de intermediários com alta absorvância ou devido à produção de substâncias cromóforas (WANG *et al.*, 2003; EISENMAN & CASADEVALL, 2012; ZHANG *et al.*, 2007; VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011).

Para analisar o problema do escurecimento do meio uma nova rota para a observação dos efeitos da degradação realizada durante a fermentação submersa foi elaborada, para que o aumento do comprimento de onda observado pudesse ser atribuído exclusivamente à ação das enzimas extracelulares sobre o corante testado. Deste modo, seria retirado o possível efeito de escurecimento do meio pela ação da linhagem fúngica através da produção de pigmentos ou compostos com elevada absorvância na faixa do visível.

Entretanto, como a linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 havia produzido escurecimento do meio durante a fermentação em estado sólido, o que seria um indício de que possivelmente ela produziria substâncias cromóforas durante o seu crescimento, a linhagem fúngica em questão foi descontinuada para que a análise pudesse ser realizada com uma linhagem fúngica sem esse possível erro potencial.

#### **VI.5 Fermentação Submersa da Linhagem *Penicillium* sp. I-13-7**

O *Penicillium* sp. I13-7 foi selecionado para a fermentação submersa por ter sido a única linhagem que promoveu uma degradação elevada de um dos corantes testados (corante RBBR em ambas as concentrações), além de não produzir pigmentos em nenhum dos 3 corantes testados nos ensaios em meio sólido, tendo ainda promovido uma degradação média/com baixa transparência em todos os corantes testados em todas as concentrações.

### VI.5.1 RB-5

Os valores obtidos na fermentação submersa da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 utilizando o corante RB-5, na concentração de 200 ppm, após 7 e 14 dias de fermentação se encontram no gráfico abaixo. A curva do corante RB-5 na concentração de 200 ppm foi explicitada na Figura VI-XVI para melhor comparação dos dados.

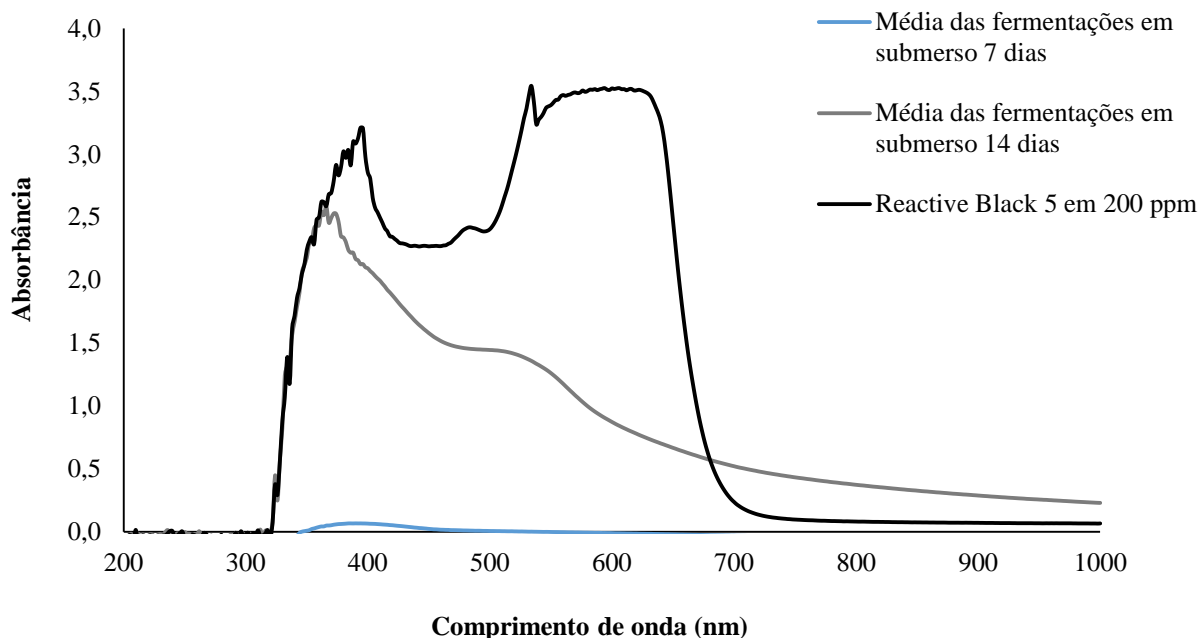


Figura VI-XVI: Fermentação submersa pela linhagem *Trichoderma* sp. linhagem I13-7 do corante RB-5 com a retirada do branco.

A partir dos dados obtidos a redução no comprimento de onda de máxima absorbância foi analisada e explicitada no gráfico de barras a seguir Figura VI-XVII:

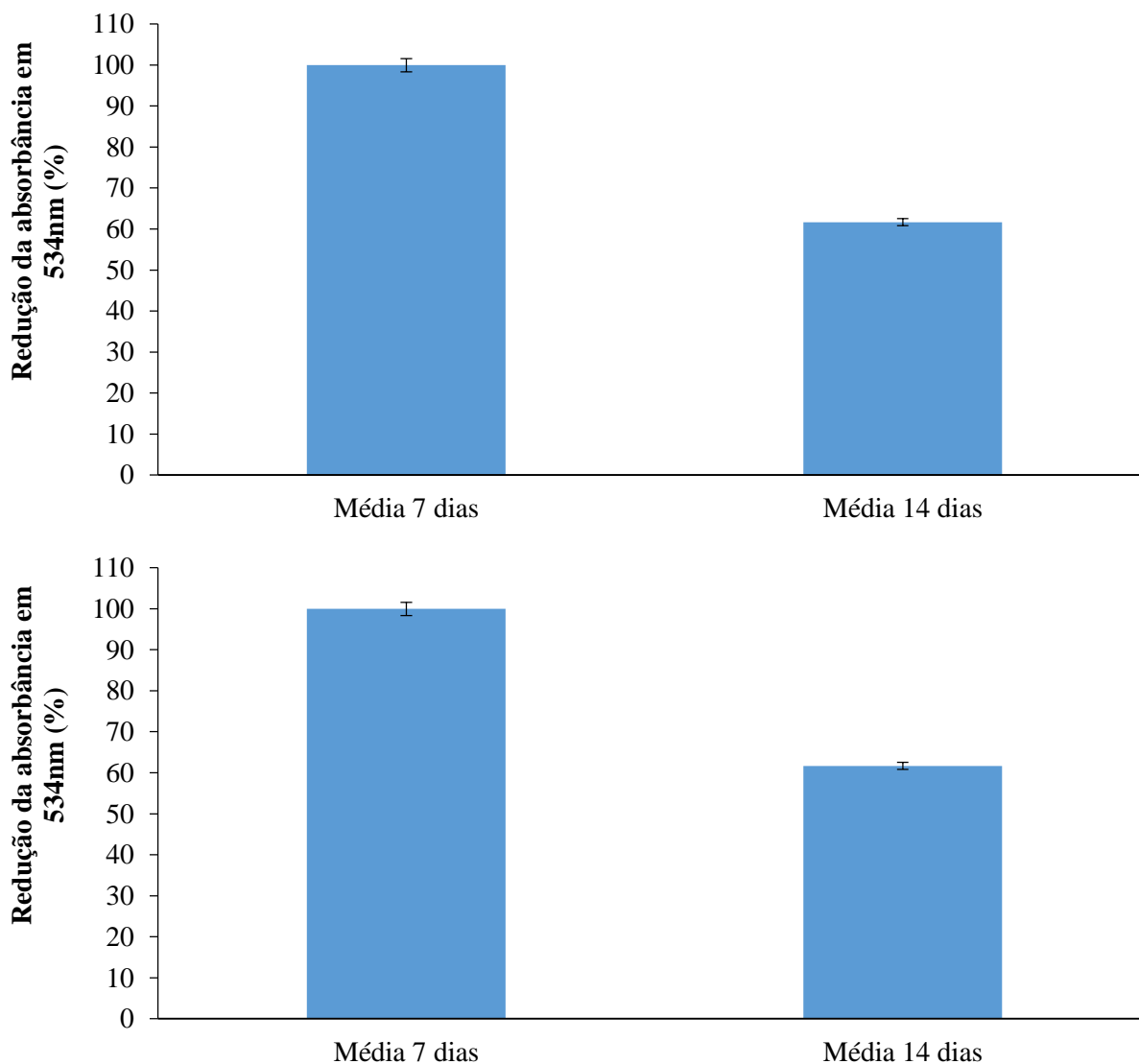


Figura VI-XVII: Redução da absorbância em 534nm para o corante RB-5 após fermentação submersa pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7.

Esses dados permitem que se afirme que todo o corante RB-5 foi degradado pela linhagem fúngica I13-7 após 7 dias de fermentação submersa. Se for considerada a redução da absorbância em 534nm como a porcentagem do corante eliminado obteremos que a oxidação do corante pelo *Penicillium* sp. I13-7 foi de 100%. A Lei de Lambert-Beer não pôde ser utilizada para aferir a concentração final de corante, já que a mesma não pode ser utilizada para concentrações menores do que 5ppm – o que foi o caso após 7 dias de fermentação.

Contudo, após 14 dias de fermentação submersa percebe-se que o a absorbância se eleva rapidamente em 364nm. Esse acréscimo no comprimento de onda pode sinalizar uma reestruturação da substância intermediária gerada em um novo composto com propriedades cromóforas mais acentuadas.

Percebe-se então que a degradação do corante não foi total em água e CO<sub>2</sub>, já que ao final foi gerado um intermediário com alta absorbância em 364nm.

Assim como foi observado com a linhagem *Trichoderma* sp. linhagem I10-8, a absorbância no comprimento de onda de máxima absorbância aumentou, se compararmos o período de 7 dias de fermentação submersa com o período de 14 dias de fermentação submersa. Isto pode ser devido à geração de um intermediário, que tenha sido degradado posteriormente, aumentando a absorbância nesse comprimento de onda em questão.

Uma proposta de rota metabólica de degradação do corante RB-5 foi explicitada na Figura VI-XVIII (ADNAN *et al.*, 2014). De acordo com o autor, a substância final encontrada seria sec-butilamina, um composto menos tóxico que o RB-5 e incolor. Possivelmente no experimento realizado pode ter sido gerada sec-butilamina após 7 dias de fermentação e a mesma pode ter sido novamente transformada em um novo composto cromóforo em 14 dias de fermentação.

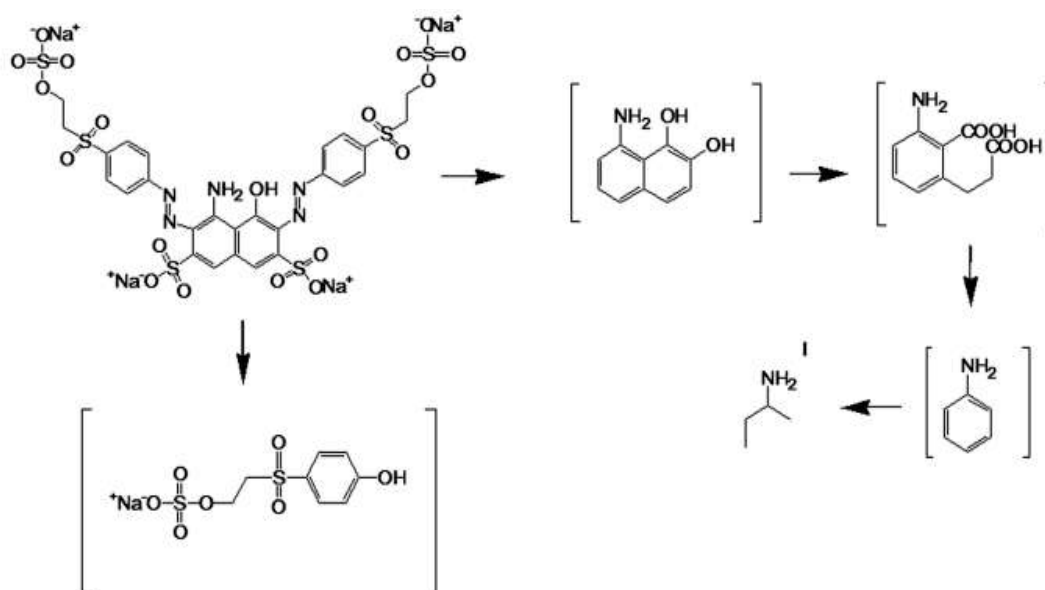


Figura VI-XVIII: Rota proposta para a degradação do corante RB-5 (ALAN *et al.*, 2014).

Comparando-se os valores obtidos na fermentação submersa da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 com a descoloração promovida por *T. gibbosa* sp., uma linhagem selvagem, que descoloriu 82,13% do corante após 15 dias de fermentação (ADNAN *et al.*, 2014), em um meio otimizado, percebemos que quando comparado à espécie *T. gibbosa* sp., a linhagem I13-7 se mostra significativamente mais potente na degradação do RB-5, uma vez que eliminou completamente o corante RB-5 após apenas 7 dias de fermentação, sem ser utilizado nenhum método de otimização do meio de cultura líquido.

Em uma outra comparação deste experimento, os valores foram comparados com espécies selvagens coletadas de um local de despejo de efluentes têxteis, cuja seleção seguiu a mesma sequência de crescimento em placa em 100ppm com o corante RB-5 a 28°C (YANG *et al.*, 2003). Foram obtidas descolorações de 100% do corante RB-5 após 12h de fermentação submersa pela levedura *Debaromyces polymorphus*, após 24h pela levedura *Candida tropicalis*, e após 48h pelo fungo *Penicillium gastrivorus*.. As linhagens citadas em questão apresentaram adsorção na sua estrutura dos corantes testados, o que não foi percebido para o *Penicillium* sp. linhagem I13-7. No experimento realizado com a espécie *Penicillium* sp. I13-7 somente foram realizadas análises a partir de 7 dias de fermentação, o que impossibilita prever a partir de quanto tempo efetivamente esta espécie promoveu a degradação total do RB-5. Além disso, é importante ressaltar que as linhagens selvagens obtidas no trabalho de Yang e colaboradores foram coletadas em um local que recebe constantemente efluentes têxteis, enquanto que neste experimento os isolados foram retirados de uma região de floresta com um mínimo de impacto humano. A seleção em um local de despejo de efluentes propicia que estas espécies em questão já tenham sido selecionadas naturalmente pela natureza ao longo dos anos por serem espécies resistentes aos corantes descartados, já possuindo mecanismos de degradação destes compostos fenólicos em questão bem desenvolvidos.

### VI.5.2 RR-120

O corante RR-120 possui comprimento de onda máximo em 518nm. Os valores obtidos para a fermentação submersa da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 no corante RR-120 se

encontram na Figura VI-XIX. A curva do corante RR-120 na concentração de 200 ppm foi explicitada para melhor comparação dos dados.

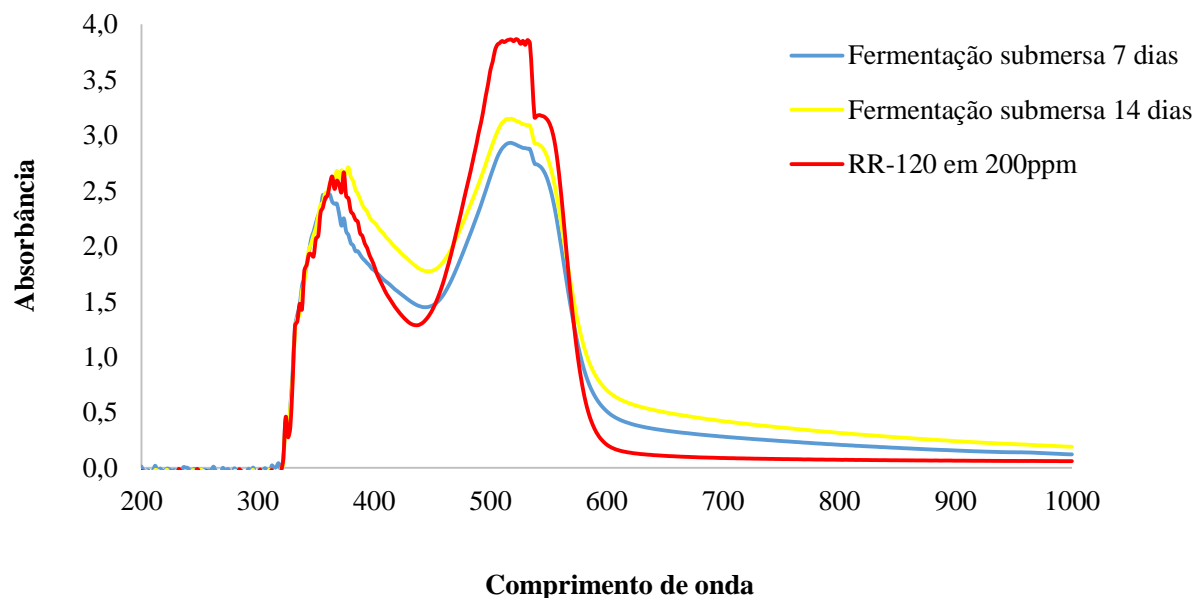
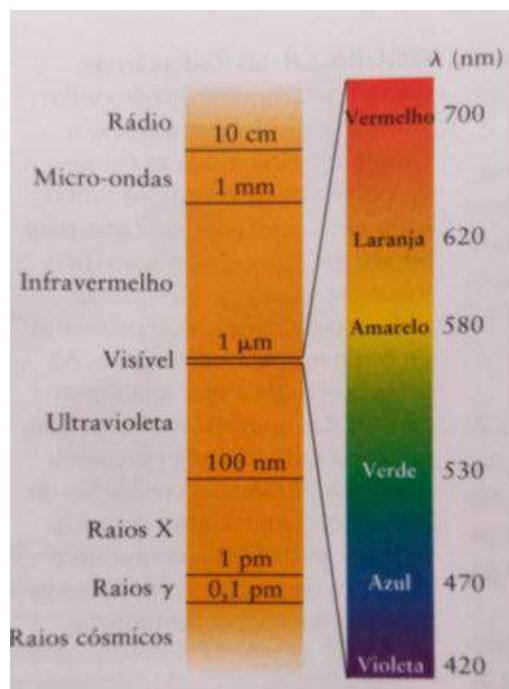


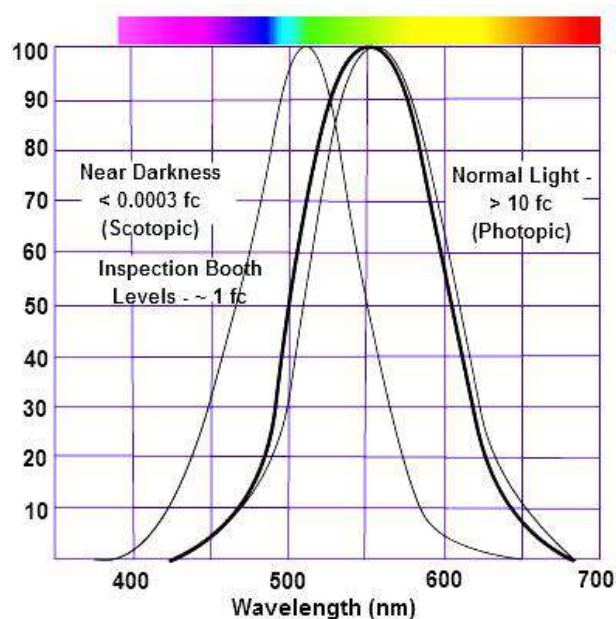
Figura VI-XIX: Fermentação submersa do corante RR-120 pela linhagem *Penicillium sp. I13-7* com a retirada do branco.

Foi verificado que ocorreu uma leve redução do comprimento de onda máximo em 518nm. O máximo local em 370nm permanece inalterado e ocorre ainda uma elevação do comprimento de onda entre 574nm até 1000nm. O aumento da absorbância nesses comprimentos de onda pode ser devido à decomposição do corante RR-120 em compostos com uma maior absorbância nessas faixas. A redução da absorbância em 518nm foi explicitada na Figura VI-XXI, percebe-se que ocorreu um elevado desvio padrão, possivelmente pela variedade de compostos cromóforos que podem ser geradas à partir do RR-120, o que eventualmente pode ter levado a diferentes rotas preferenciais para cada réplica (VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011).

Conforme a Figura VI-XX, verifica-se que a elevação no comprimento de onda de 600nm até 700nm que ocorreu durante a fermentação é a responsável pelo aumento da absorção na faixa do vermelho, mantendo a coloração do meio de cultura vermelha.



Espectro de luz visível 400-700nm



A curva da direita (mais escura) indica a sensibilidade do olho humano em ambientes claros, já a curva da esquerda em ambientes escuros

Figura VI-XX: Espectro de luz visível, (ATKINS & JONES, 2012) e sensibilidade do olho humano à luz visível (NDT, 2014).

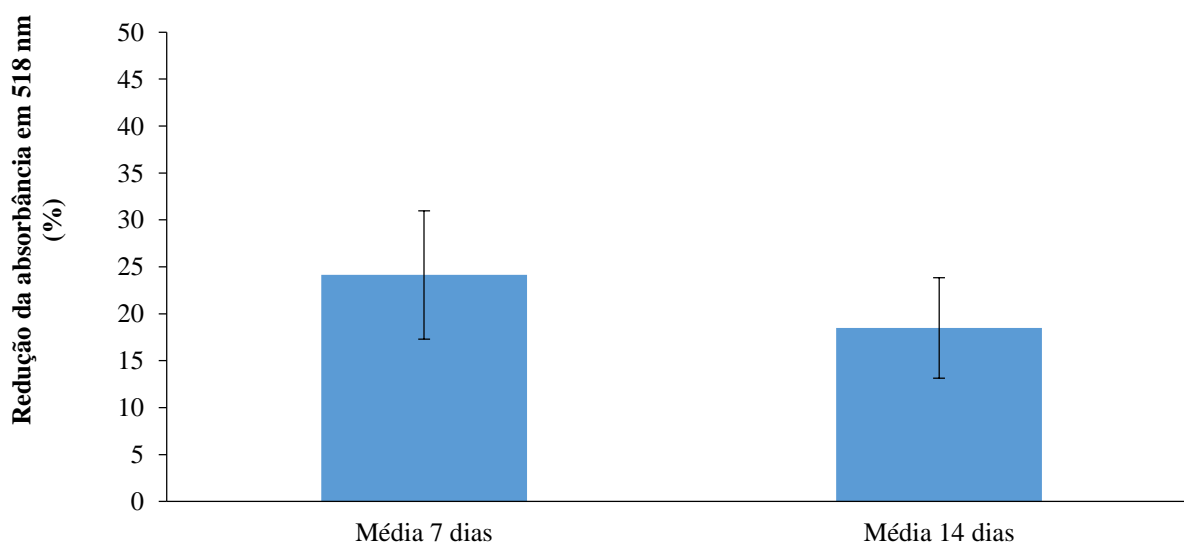


Figura VI-XXI: Redução da absorbância em 518nm para o corante RR-120 após 7 dias de fermentação pelo *Penicillium sp. I13-7*



Estes dados indicam que ocorreu uma baixa degradação do corante Reactive Red 120 pela linhagem fúngica I13-7. Levando-se em conta a redução da absorbância em 518nm como a porcentagem do corante eliminado (BARRETO, 2006; CARDOSO, 2010), se obtém que a redução da coloração do corante pelo *Penicillium sp.* I13-7 foi de aproximadamente 24,12% após 7 dias de fermentação submersa.

Utilizando a Lei de Lambert-Beer para a absorbância média (2,9305) após 7 dias de fermentação, obtém-se uma concentração final de 163,4ppm, o que indica uma oxidação do corante original de 18,3%.

Quando compara-se os valores de 14 dias de fermentação submersa com 7 dias percebemos que este valor expõe, novamente, que ocorreu um aumento da absorbância. Isto demonstra que apesar da baixa redução de absorbância encontrada para o RR-120 pelo *Penicillium sp.* I13-7, provavelmente estão sendo gerados compostos cromóforos que ainda mantém uma elevada absorbância no comprimento de onda de 534nm, o que prejudica a avaliação real de degradação do corante pela Lei de Lambert-Beer (ZHANG *et al.*, 2007; VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011).

Comparando o *Penicillium sp.* linhagem I13-7 com outra linhagem selvagem identificada como *Bjerkandera adusta*, cuja fermentação submersa para o corante RR-120 foi realizada na mesma temperatura e com 150 rpm de rotação, obtém-se que a descoloração do *B. adusta* foi de 100% do corante RR-120 após 3 dias de fermentação submersa, enquanto que a descoloração da linhagem I13-7 chegou a apenas 24,12% de descoloração após 7 dias de fermentação submersa (SODANEATH *et al.*, 2017). A baixa degradação deste corante pelo *Penicillium sp.* I13-7 pode ser devida à geração de intermediários com elevada absorbância que prejudicariam a análise real da degradação do corante.

### VI.5.3 DY-27

Os valores obtidos para a fermentação submersa da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 no corante DY-27 após 14 dias de fermentação se encontram na Figura VI-XXII. A curva do corante DY-27 na concentração de 200 ppm foi explicitada para melhor comparação dos dados.

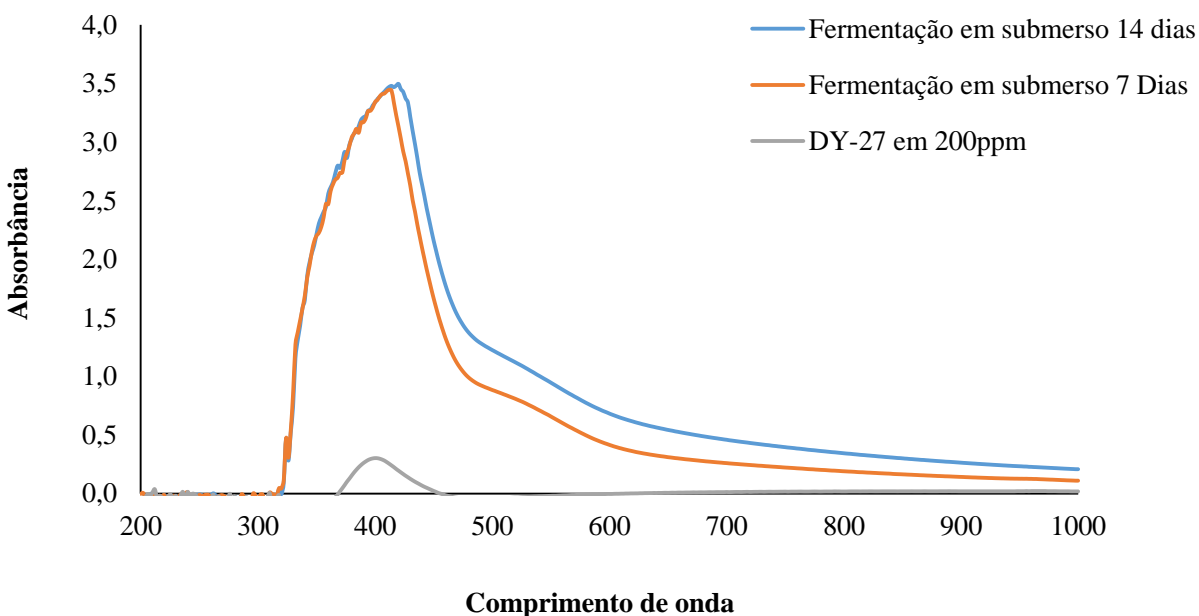


Figura VI-XXII: Fermentação submersa do corante DY-27 pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7 com a retirada do branco.

O gráfico expõe que o comprimento de onda máximo do corante foi modificado após a fermentação submersa. O comprimento de onda máximo que se localizava anteriormente em 400nm foi realocado para o comprimento de onda de 420nm. Além disso, todos os comprimentos de onda a partir de 318nm receberam um significativo acréscimo na sua absorbância, conforme Figura VI-XXIII.

Esses dados indicam que ocorreu uma degradação do corante DY-27 e/ou ocorreu a produção de alguma substância com elevada absorbância pelo *Penicillium* sp. I13-7 na presença de um corante do tipo direto.

Existem muito poucos estudos sobre o corante DY-27, o mais relevante para este trabalho seria o estudo sobre a espectroscopia do DY-27 (GIRI *et al.*, 2010) que comprova que o

comprimento de onda de máxima absorvência é em 400nm. Não existem trabalhos na literatura que discorram sobre os mecanismos de degradação do DY-27, nem existem trabalhos publicados de degradação empregando microorganismos para a degradação do mesmo. A toxicidade dos compostos intermediários e finais gerados pela degradação do DY-27 é brevemente abordada em Byberg e colaboradores (2013) , mas não foi devidamente explorada de modo que o escurecimento apresentado neste experimento possa ser devidamente correlacionado.

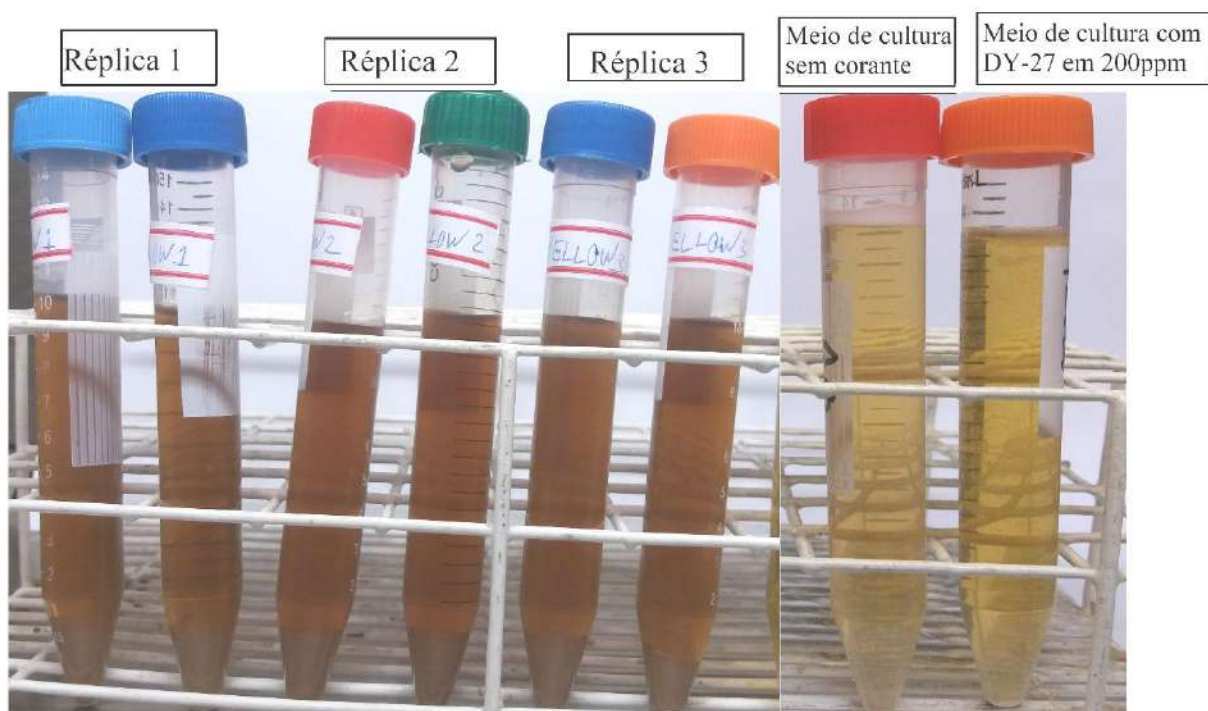


Figura VI-XXIII: Réplicas da fermentação em submerso do DY-27 após 14 dias de fermentação pelo *Penicillium sp. I13-7*.

#### VI.5.4 Discussão

O *Penicillium sp.* linhagem I13-7 se mostrou promissor para a degradação de compostos fenólicos, embora a avaliação real do seu desempenho em fermentação submersa tenha sido comprometida devido à geração de substâncias com alta absorvência no visível durante a fermentação do corante DY-27, RR-120 e RB-5. Observou-se um aumento significativo da absorvência na fermentação em 14 dias quando comparada à fermentação em 7 dias para os

corantes testados. Este aumento possivelmente se deve à geração de intermediários durante a fermentação submersa, fato que deverá ser mais estudado antes de ser feita qualquer afirmação.

A geração de intermediários com absorvância no mesmo comprimento de onda que o comprimento de máxima absorvância torna imprecisa a avaliação da concentração final do corante através do uso da Lei de Lambert-Beer, já que a existência desses compostos causa interferência no teste, indicando uma redução da concentração do corante menor do que a redução real. Logo, pode-se afirmar que até o momento, no mínimo, verificou-se a degradação de 18,4% do corante RR-120 e de 100% do corante RB-5. A degradação do corante DY-27 não pôde ser aferida.

Como essa linhagem fúngica não havia produzido escurecimento do meio na fermentação em estado sólido, o que indica uma menor probabilidade de geração de pigmentos pela linhagem fúngica, ela foi selecionada para realizar uma análise final utilizando a nova rota de observação – que leva em consideração os efeitos das enzimas extracelulares produzidas pelo fungo na fermentação para a degradação dos corantes em questão. Deste modo, o aumento das absorvâncias observadas poderá ser atribuído exclusivamente à ação das enzimas sobre o corante testado, retirando o possível efeito de escurecimento do meio pela ação da linhagem fúngica, seja através da produção de pigmentos ou através da produção de compostos com elevada absorvância na faixa do visível.

### **VI.3.3 Discussões Gerais sobre as Fermentações submersas e Motivos para a Nova Abordagem**

Ambas as linhagens fúngicas apresentaram problemas na avaliação do percentual real de corante que foi degradado. A linhagem *Trichoderma* sp. I10-8 apresentou um forte escurecimento do meio durante a fermentação submersa dos corantes RB-5 e DY-27, enquanto que o mesmo se passou para a linhagem *Penicillium* sp. I13-7, principalmente no meio contendo DY-27.

A linhagem I10-8 não foi utilizada na nova abordagem, uma vez que ela produziu um escurecimento do meio sólido durante a fermentação em estado sólido e promoveu o

escurecimento do meio de cultura em todas as fermentações submersas. Como esta linhagem potencialmente produziria um escurecimento do meio em cada fermentação em submerso e o seu potencial real de degradação não poderia ser aferido, as suas análises foram interrompidas.

Todos os corantes testados apresentaram um aumento da absorbância quando comparamos 7 dias de fermentação submersa com 14 dias de fermentação. Isso pode ser devido à uma degradação incompleta dos corantes testados, o que geraria intermediários com alta absorbância nos intervalos de interesse (ZHANG *et al.*, 2007; VELMURUGAN & SWAMINATHAN, 2011; WANG *et al.*; 2003; EISENMAN & CASADEVALL, 2012).

Como ocorreu um aumento de absorbância com o decorrer da fermentação submersa, os dados obtidos através da degradação submersa convencional não podem ser utilizados na Lei de Lambert-Beer com precisão. Isto, porque a presença de outras substâncias –que não sejam a de interesse – que possuam elevada absorbância no comprimento de onda observado interferem na precisão desse teste, gerando uma falsa concentração final de corante, já que com o aumento de absorbância no comprimento de onda avaliado a Lei de Lambert-Beer indica uma menor degradação do corante de interesse.

Para descartar quaisquer interferências por meio da produção de substâncias cromóforas pelas linhagens fúngicas testadas no meio de cultura e para eliminar também a indução da produção de quaisquer substâncias de elevada absorbância pelos fungos filamentosos devido aos corantes na fermentação submersa, novos experimentos foram realizados com uma abordagem nova para verificar a atuação das enzimas extracelulares produzidas pelos fungos sem a indução dos corantes.

#### **VI.4 Análise Através do Meio Fermentado pela linhagem *Penicillium sp.* I13-7**

##### **VI.4.1 RB-5**

O espectro do meio fermentado foi analisado após a adição de cada corante na concentração de 200ppm. Este espectro será posteriormente comparado com a fermentação submersa para que as análises e hipóteses possam ser mais bem discutidas. A seguir, podemos observar o espectro do meio ao longo do tempo (em minutos), conforme *Figura VI-XXIV*.

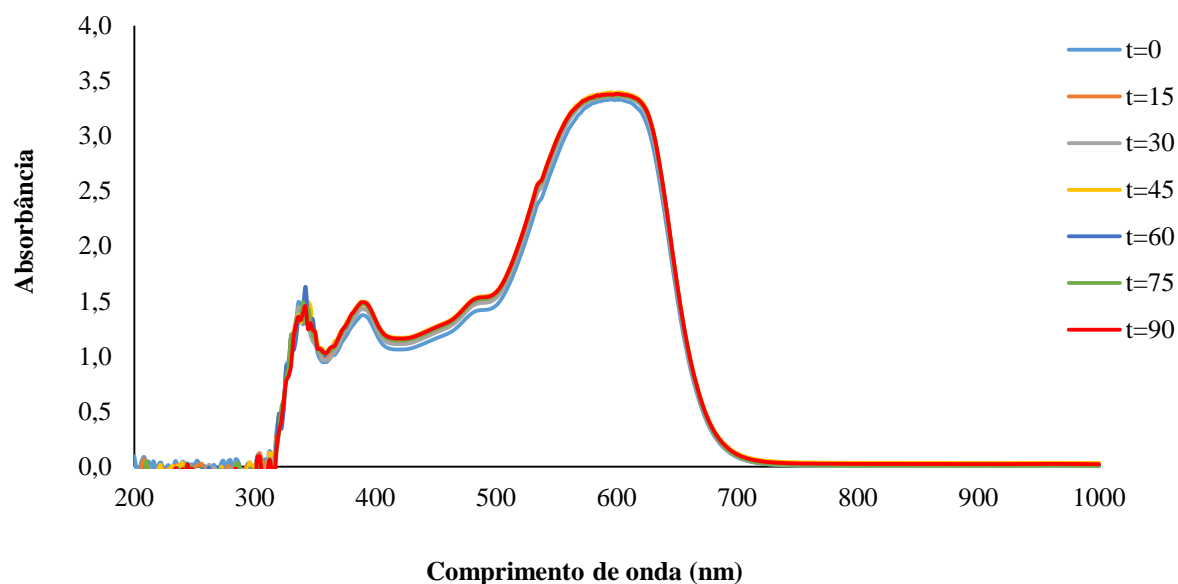


Figura VI-XXIV: Espectro do meio fermentado pela linhagem *Penicillium sp. I13-7* após a adição de corante RB-5 na concentração de 200ppm.

Como pode ser observado no gráfico, ocorreu uma baixa variação do espectro ao longo do tempo de análise para a adição do corante RB-5 em 200ppm no meio fermentado pela linhagem *Penicillium sp. I13-7*. Isso expõe que as enzimas extracelulares que foram produzidas pelo fungo no meio de cultura modificado, sem a adição do corante, agiram quase que instantaneamente no corante RB-5.

Os dados obtidos foram agrupados com os espectros da fermentação submersa para que possa ser melhor visualizada as variações em relação à fermentação submersa na Figura VI-XXV.

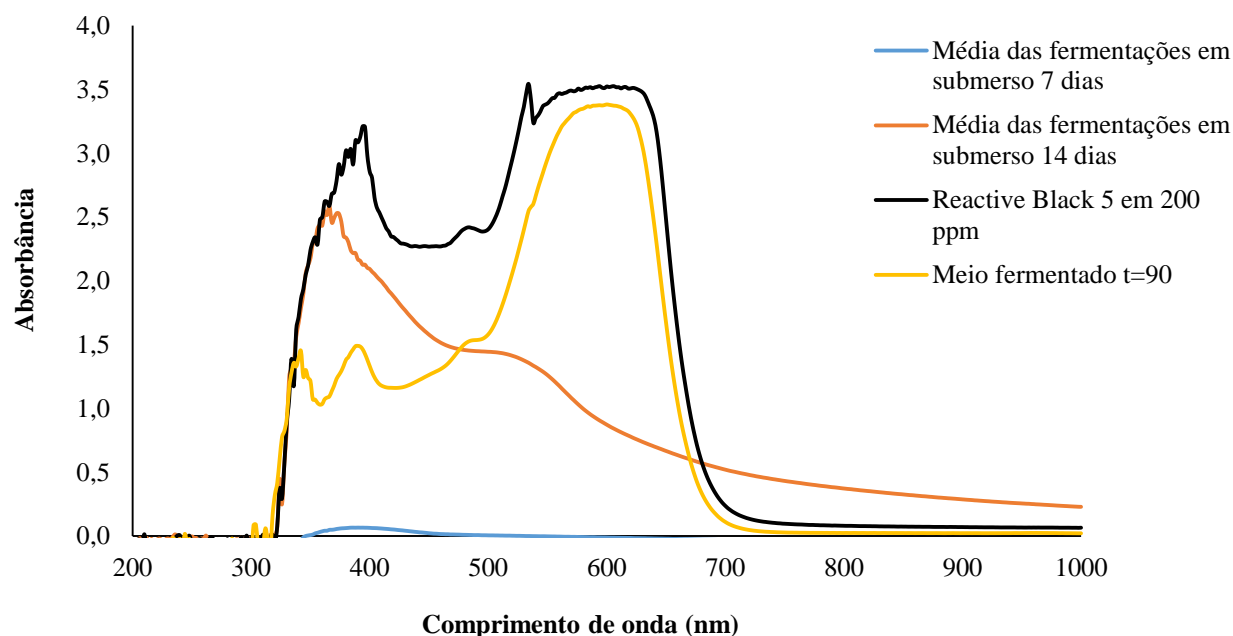


Figura VI-XXV: Comparação dos dados obtidos na Fermentação submersa com o Espectro do Meio Fermentado para a linhagem *Penicillium sp. I13-7*.

Das análises anteriores, se inferiu que a média da fermentação submersa após 7 dias de fermentação comprovaria uma degradação de 100% do corante Reactive Black contido no meio de cultura modificado. A redução da absorbância eliminou completamente os máximos globais e locais, localizados em 534 e 392nm respectivamente. Contudo, após 14 dias de fermentação submersa houve um acréscimo significativo da absorbância no comprimento de onda de 364nm, isto indica que provavelmente em 7 dias de fermentação submersa foi gerado um intermediário que precisaria ser analisado, mas que possivelmente seria sec-butilamina, e que foi posteriormente degradado pela linhagem *Penicillium sp. I13-7* produzindo um composto com elevado comprimento de onda em 364nm em 14 dias de fermentação submersa.

Como os espectros obtidos para o meio fermentado foram muito similares, e considerando que o meio fermentado com o maior tempo de observação seria o que mais se aproximaria de uma fermentação submersa – já que expõe o corante às enzimas extracelulares por um maior tempo – somente o tempo 90 minutos para o meio fermentado foi adicionado ao gráfico para a comparação.

Pode-se observar que o meio fermentado produziu uma redução da absorvância observada para o corante RB-5 em 200ppm em todos os comprimentos de onda. As reduções mais significativas para a análise foram as do comprimento de onda de máxima absorvância que é 534nm, onde ocorreu uma redução de 25,5% na absorvância, e no máximo local localizado em 392nm em que ocorreu uma redução de 52,4% da absorvância. A concentração final do corante RB-5 não pôde ser aferida, uma vez que a Lei de Lambert-Beer gerada para o comprimento de máxima absorvância só é válida para concentrações abaixo de 100ppm.

No meio fermentado a redução de 52,4% no máximo local exprime que a linhagem *Penicillium* sp. I13-7 é plenamente capaz de reduzir os valores de absorvância localizados na faixa de 338 a 472nm a valores inferiores aos valores observados após 14 dias de fermentação submersa. Esse fato é corroborado pela fermentação submersa após 7 dias que eliminou completamente o corante RB-5.

Tem-se ainda, que a fermentação em estado sólido da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 apresentou uma degradação média do corante RB-5 e uma degradação em certo nível de todos os corantes testados em todas as concentrações, demonstrando o poder deste fungo em agir sobre substâncias fenólicas.

Espera-se que a presença do corante no meio de cultura modificado em que foram realizadas as fermentações submersa seja um indutor para a produção de enzimas extracelulares responsáveis pela degradação do corante em questão (TRELLA *et al.*, 2006). O que reduziria ainda mais a absorvância do corante se comparada com o meio fermentado, que seria um meio de cultura que não recebeu nenhum tipo de indução.

Somando esses fatos, fica claro que a linhagem *Penicillium* sp. I13-7 é capaz de degradar completamente o corante RB-5 em 200ppm após 7 dias de fermentação submersa. Contudo, é gerado um intermediário que pode ser degradado pela própria Linhagem I13-7 e que gera um aumento da absorvância no comprimento de onda de 366nm.

Já que o principal problema dos efluentes têxteis é atribuído à sua coloração, além da sua toxicidade (SARAYU & SANDHYA, 2012; LIM *et al.*, 2010), esta linhagem fúngica poderia ser utilizada para um pré-tratamento que promovesse a remoção da coloração do efluente, além de tornar o efluente mais fácil de ser oxidado por métodos físico-químicos (LADE *et al.*, 2012).



Abaixo, na Figura VI-XXVI resalta-se a melhor degradação do corante RB-5, que foi realizada pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7 após 7 dias de fermentação submersa, com o percentual de corante degradado sendo exposto na Figura VI-XXVII.

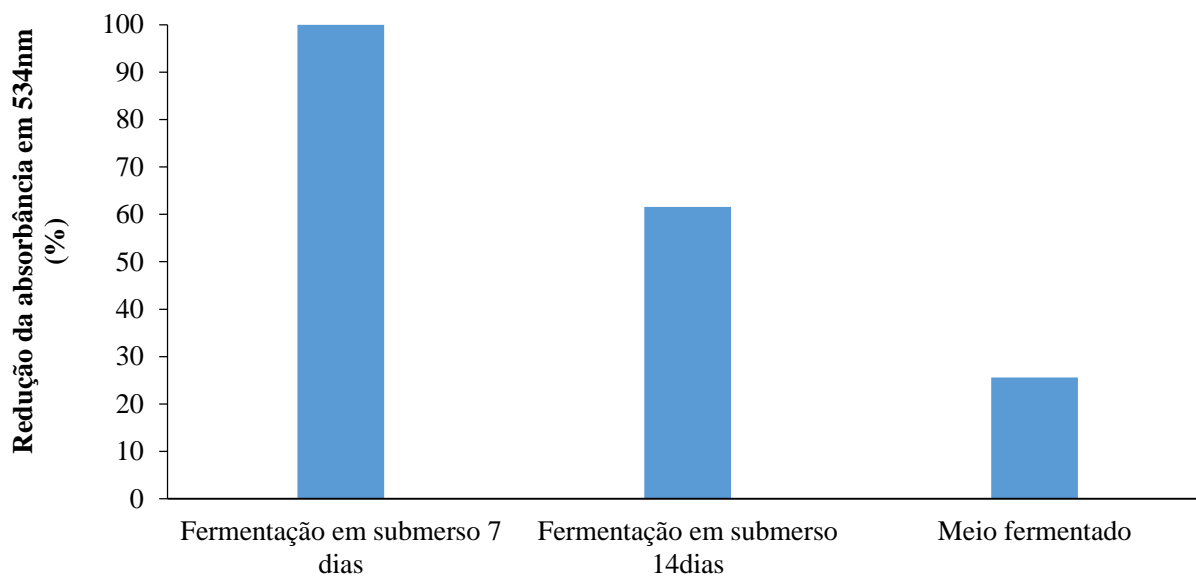


Figura VI-XXVI: Melhor degradação do Corante RB5, ocorrida na fermentação submersa da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 após 7 dias.

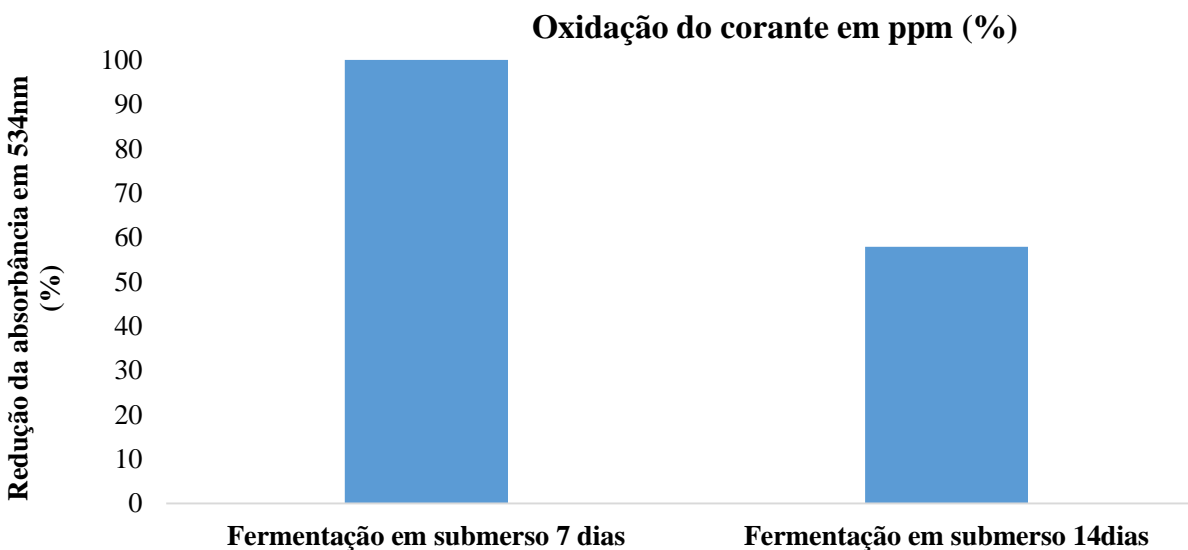


Figura VI-XXVII: Percentual do corante RB-5 oxidado. O percentual em 14 dias de fermentação submersa foi afetado pela produção de um intermediário.

#### VI.4.2 RR-120

A seguir, na Figura VI-XXVIII, pode-se observar o espectro do meio fermentado após a adição de corante em 200ppm, ao longo do tempo (os tempos estão em minutos).

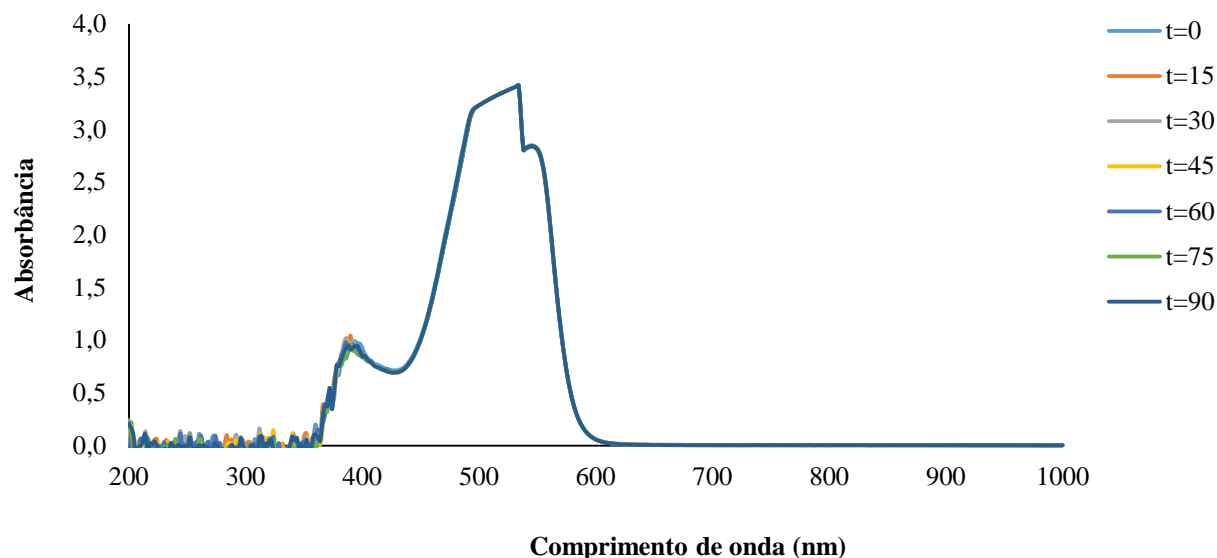


Figura VI-XXVIII: Espectro do meio fermentado pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7 após a adição de corante RR-120 na concentração de 200ppm.

Como pode ser observado no gráfico, não ocorreu uma variação do espectro ao longo do tempo de análise para a adição do corante RR-120 em 200ppm no meio fermentado pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7. Isto expõe que as enzimas extracelulares que foram produzidas pelo fungo no meio de cultura modificado sem a adição do corante agiram quase que instantaneamente no corante supracitado, quando compara-se com o corante na concentração de 200ppm que pode ser visualizado na Figura VI-XXIX abaixo:

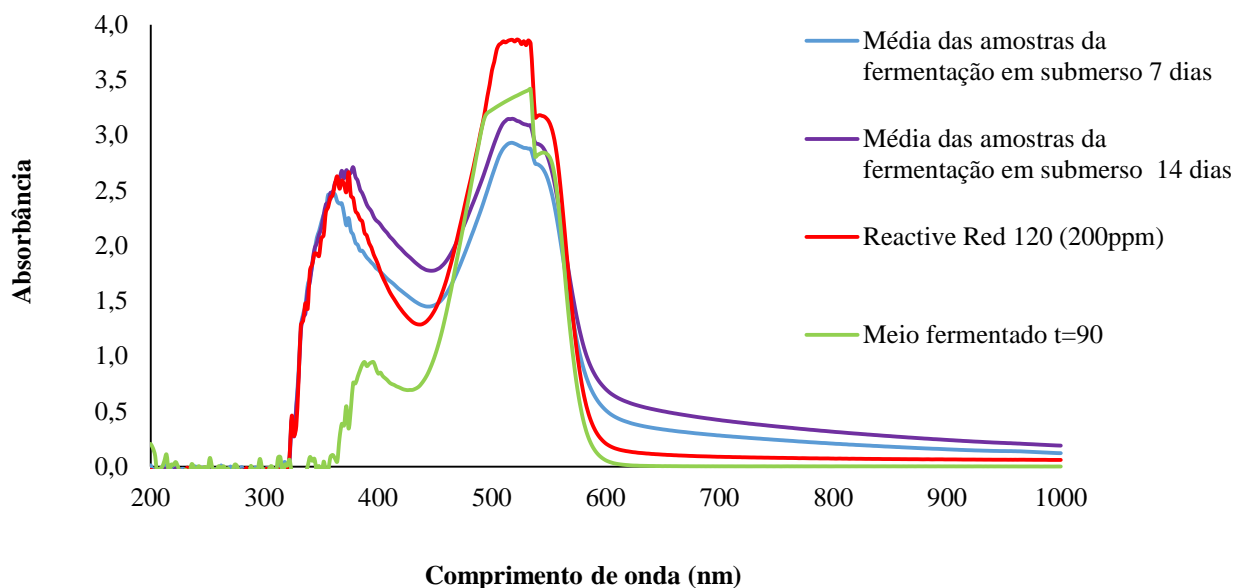


Figura VI-XXIX: Comparação dos dados obtidos na fermentação submersa com o meio fermentado pela linhagem *Penicillium sp.* I13-7.

Observa-se que a média das fermentações submersa após 7 dias de fermentação mostra uma redução da absorvância no comprimento de onda de máxima absorvância (518nm) de 24,4%. Contudo, após 14 dias de fermentação submersa houve um acréscimo da absorvância no comprimento de onda de 518nm quando comparada a 7 dias de fermentação, isso possivelmente indica que foi gerado um intermediário que possui uma elevada absorvância nesse comprimento de onda. Como os espectros obtidos para o meio fermentado foram muito similares, e considerando que o meio fermentado com o maior tempo de observação seria o que mais se aproximaria de uma fermentação submersa, já que expõe o corante às enzimas extracelulares por um maior tempo, somente o tempo 90 minutos para o meio fermentado foi adicionado ao gráfico para a comparação.

Pode-se observar que o Meio fermentado produziu uma diminuição da absorvância observada para o corante RR-120 em 200ppm em todos os comprimentos de onda. As reduções mais significativas foram as do comprimento de onda de máxima absorvância que é 518nm, onde ocorreu um abaixamento de 13,5% na absorvância, e no máximo local localizado em 374nm em que ocorreu uma redução de 80,4% da absorvância. A redução do máximo local, se deveu a uma redução significativa da absorvância entre 322nm a 474nm.

A redução de 80,4% no máximo local sem a indução do corante exprime que *Penicillium sp.* I13-7 é plenamente capaz de reduzir os valores de absorvância localizados na faixa de 318nm a 476nm a valores inferiores aos valores observados após 14 dias de fermentação submersa. Esse fato é corroborado pela fermentação submersa após 7 dias que também obteve valores de absorvância menores que a fermentação após 14 dias de fermentação submersa. Todos estes dados levam a crer que o aumento de absorvância observado deve ser função da geração de um intermediário após a degradação do corante RR-120, conforme descrito por Wang et al.; 2003; Eisenman & Casadevall, 2012; Zhang et al.,2007; Velmurugan & Swaminathan, 2011.

Como a redução no máximo local foi extremamente relevante, foi elaborada uma nova Lei de Lambert-Beer para o comprimento de onda em questão, expressa na Figura VI-XXX.

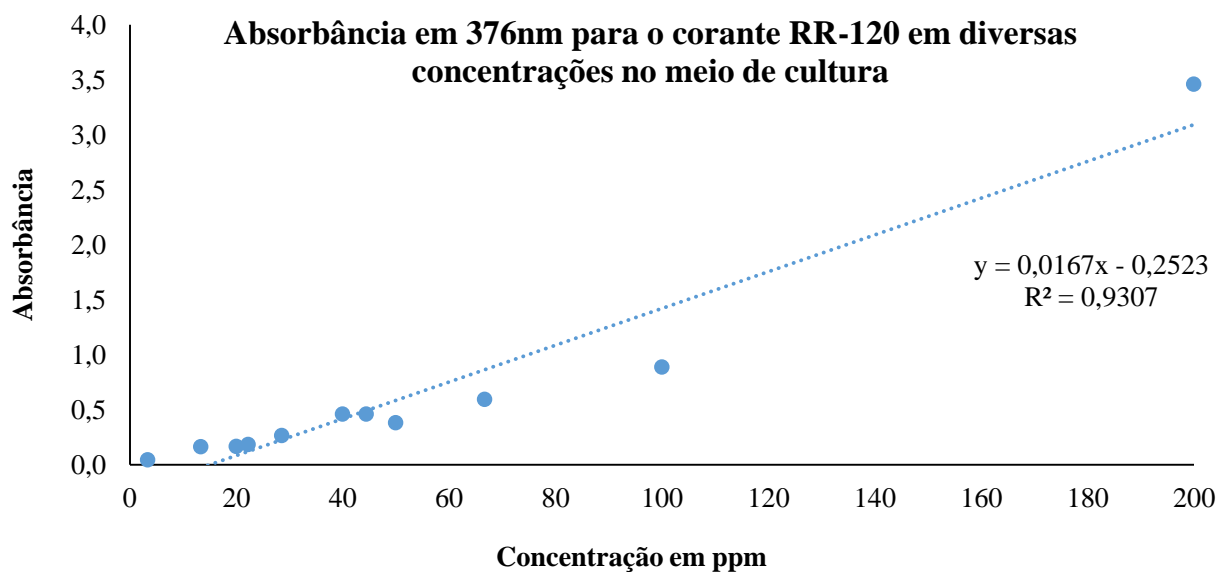


Figura VI-XXX: Absorvância em 376nm para o corante RR-120 no meio de cultura (válido de 3 a 200ppm).

Segundo a nova Lei de Lambert-Beer que foi gerada para o comprimento de onda máximo local: Absorvância =  $0,0167 \times$  Concentração em ppm - 0,2523 . A precisão dessa equação é de 93% e ela é válida de 3ppm até 200ppm no comprimento de onda de 376nm.

O valor de absorvância observado para o Meio fermentado após 90 minutos foi de 0,526. Com este valor obteve-se a concentração de 46,6ppm de corante RR-120 ao final dessa análise,

ou seja uma redução de 76,7% do corante inicialmente introduzido ao meio de cultura. Essa degradação foi parcial e não total, mas ainda é uma redução significativa do corante introduzido. Na fermentação submersa, a redução do percentual de corante inicial provavelmente foi ainda maior, devido à indução (TRELLA *et al.*, 2006) só que não foi possível mensurá-la experimentalmente com as análises realizadas.

Em suma, fica claro que *Penicillium sp.* I13-7 é capaz de degradar pelo menos parcialmente o corante RR-120 em 200ppm. Contudo, aparentemente são gerados intermediários que podem ser degradado pela própria linhagem I13-7 e que promovem um aumento da absorbância no comprimento de onda de máxima absorbância, afetando as análises. Considerando a redução do comprimento de onda de máximo local em 374nm pode-se observar na fermentação pelo meio fermentado uma significativa redução do percentual de corante, ainda que esta seja uma degradação parcial e não total. Na Figura VI-XXXI, ressalta-se a melhor degradação do corante RR-120 pela linhagem I13-7, que foi observada após 14 dias do experimento do meio fermentado, enquanto que na Figura VI-XXXII é expressa a redução em ppm do corante em questão.

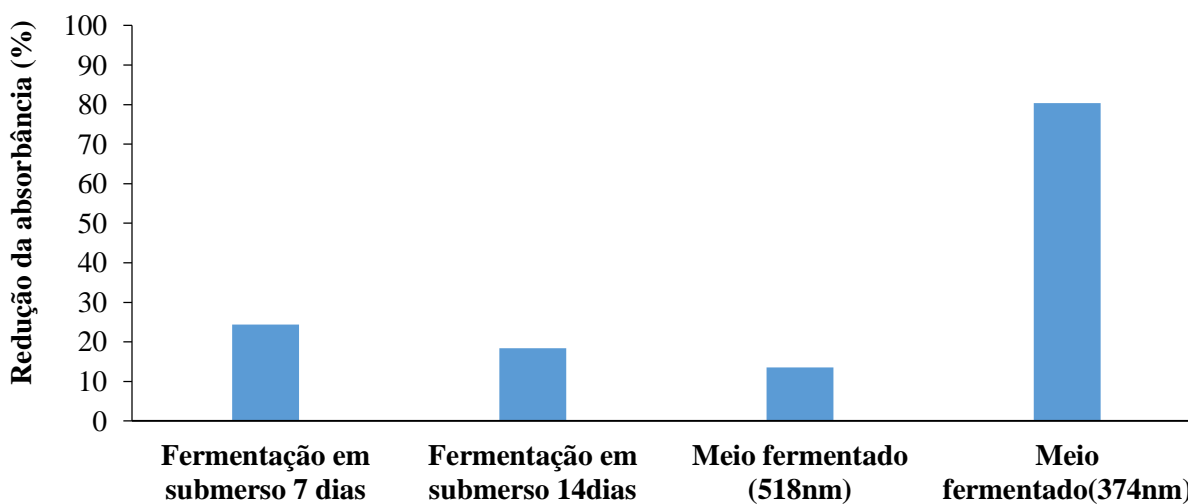


Figura VI-XXXI: Melhor degradação do Corante RR-120, ocorrida no experimento do meio fermentado pela linhagem *Penicillium sp.* I13-7 após 14 dias.

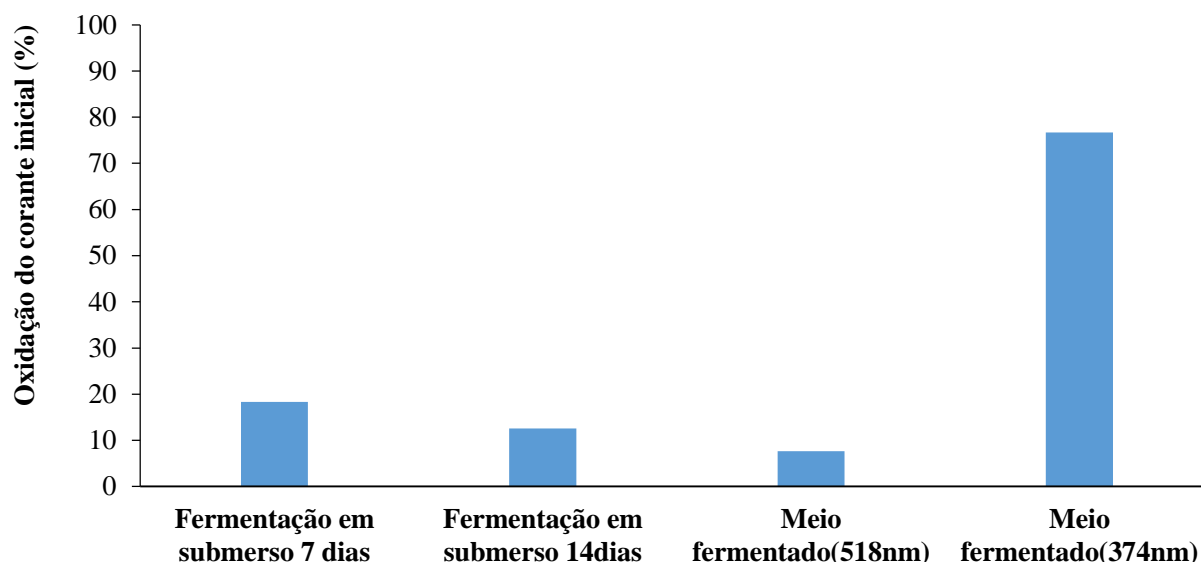


Figura VI-XXXII: Oxidação do corante RR-120 em ppm – percentualmente. O percentual em 14 dias de fermentação submersa foi afetado pela produção de um intermediário.

Embora a linhagem *Penicillium* sp. I13-7 não tenha conseguido degradar completamente o corante RR-120, segundo as análises, o valor de descoloração de 80,4% após 14 dias de fermentação é expressivo e embora não alcance os 100% de descoloração obtido pelo linhagem *B. adusta* (SODANEATH *et al.*, 2017), os resultados foram suficientemente elevados para considerar-se que a linhagem I13-7 possui um potencial biotecnológico para a degradação do RR-120 e que poderá alcançar resultados ainda melhores após uma otimização dos meios de cultura e/ou uma modificação genética.

#### VI.4.3 DY-27

O espectro do meio fermentado foi analisado ao longo do tempo após a adição do corante DY-27 na concentração de 200ppm na Figura VI-XXXIII. Cada uma das linhas é um tempo determinado após a adição do corante. O tempo referente a cada cor está expresso no canto superior direito em minutos.

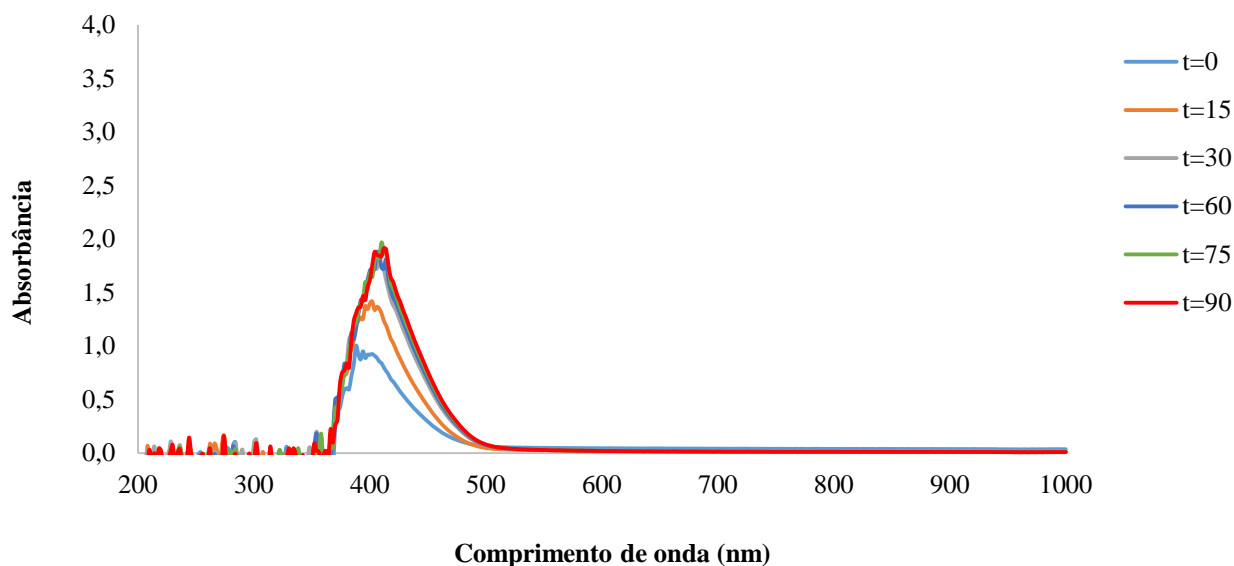


Figura VI-XXXIII: Espectro do meio fermentado pela linhagem *Penicillium sp.* I13-7 após a adição de corante DY-27 na concentração de 200ppm.

Através da observação ao longo do tempo, percebe-se que embora algumas enzimas atuem quase que imediatamente na degradação do corante DY-27, outras só agem depois de algum tempo, chegando a uma estabilidade após 90 minutos de observação.

Esses resultados serão comparados na Figura VI-XXXIV com o espectro das fermentações submersa e com o espectro do corante Direct Yellow para a melhor comparação dos dados obtidos, de modo a possibilitar uma discussão sobre os resultados observados.

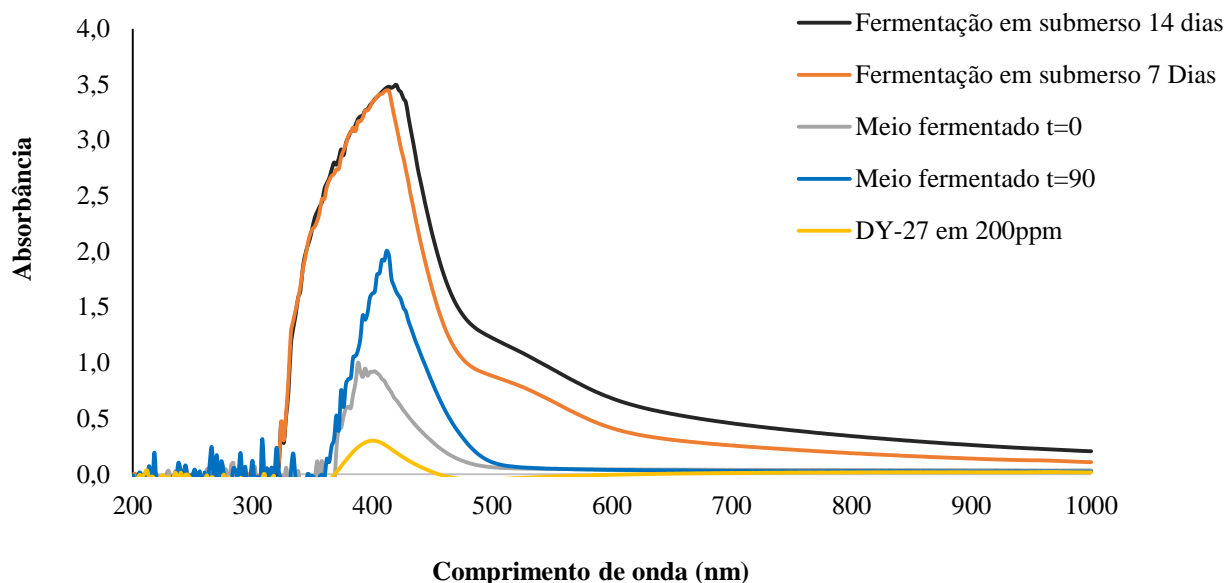


Figura VI-XXXIV: Comparação dos dados obtidos na Fermentação submersa com o Espectro do Meio Fermentado pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7.

Na fermentação submersa foi observada uma elevação do comprimento de onda de máxima absorção dos iniciais 400nm para 420 nm. Além disso, a absorbância aumentou significativamente em todos os comprimentos de onda, em relação ao meio com o corante puro.

Pode-se observar que o meio fermentado no tempo 0 possuía uma curva de absorbância mais próxima à curva do corante DY-27, e que esta curva foi se assemelhando cada vez mais às curvas da fermentação submersa, chegando ao tempo 90 minutos com um comprimento de onda de máxima absorbância de 420nm – o mesmo observado na fermentação submersa.

Esse fato expõe com certeza que a degradação do corante DY-27 pelas enzimas extracelulares produzidas pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7 foi a responsável pelo escurecimento do meio na fermentação submersa, já que após a adição do corante no meio fermentado o escurecimento do meio de cultura seguiu os mesmos padrões observados anteriormente na fermentação submersa.

Não é possível aferir com exatidão o percentual de corante Direct Yellow que foi degradado pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7, contudo, é possível afirmar-se que durante a fermentação submersa uma maior percentagem de corante foi degradada, já que as curvas da



fermentação submersa atingiram maiores valores de absorbância se comparadas com as curvas dos meios fermentados. Esse fato é condizente com a indução que ocorre quando o corante está presente no meio de cultura durante toda a fermentação (TRELLA *et al.*, 2006).

#### VI.4.4 Discussões Sobre a Nova Abordagem

Com a nova abordagem utilizando o meio fermentado foi possível se observar determinadas características dos espectros de absorbância que corroboraram os resultados obtidos anteriormente com a fermentação submersa.

Além disso, observou-se como ocorria a degradação dos corantes ao longo do tempo quando expostos às enzimas extracelulares secretadas pelos fungos durante uma fermentação submersa sem indução de corante.

Finalmente, essa abordagem pôde não só comprovar que o escurecimento que estava ocorrendo em alguns meios de cultura não era função da produção de substâncias cromóforas por parte da linhagem fúngica em questão, como também expôs que esse escurecimento era devido à degradação dos corantes pelas enzimas extracelulares presentes no meio em que o corante foi adicionado.

Além disso, foi possível identificar de uma degradação do corante RR-120 de 76,7%, uma redução significativamente maior do corante, em relação ao que era acreditado analisando-se somente os espectros dos meios somente através da fermentação submersa. Estes novo valor de degradação indica um considerável aumento do potencial biotecnológico da linhagem *Penicillium* sp. I13-7, uma vez que este fungo conseguiu degradar 100% do corante RB-5 ao final de 7 dias de fermentação submersa e no mínimo 76,7% do corante RR-120 após 14 dias de fermentação submersa, além de ter realizado significativa degradação nos experimentos em placas de petri. Comparando-se estes valores com algumas taxas de descoloração observadas para diferentes espécies, conforme a Tabela VIII, percebe-se que *Penicillium* sp. I13-7 possui uma taxa de degradação de corante elevada. Todas as linhagens presentes na Tabela VIII possuem destaque na degradação de corantes. A linhagem *Phanerochaete chrysosporium*, por exemplo, é considerada como um modelo no estudo de degradação de compostos poluentes.

Espécies como *Pleurotus sajor-caju* já foram utilizadas como biorremediadores de corantes têxteis e apresentaram um elevado potencial para o tratamento biológico (KAMIDA & DURRANT, 2005)

Tabela VIII: Relação de alguns fungos da podridão branca capazes de descolorir corantes sintéticos.

<b>Fungo</b>	<b>Corantes</b>	<b>Taxa de descoloração (%)</b>	<b>Tempo (dias)</b>
<i>Phellinus gilrus</i>	CI Vat Blue I	100	4
<i>Pleurotus sojar-caju</i>	Sp-g (diazó)	89	28
<i>Phanerochaete cryosporum</i>	Cm-s (diazó)	88	
	Brilhant green	100	
	Cristal violeta	95,2	
	Vermelho cresol	81,4	5
<i>Phlebia floridensis</i>	Vermelho congo	98	
	Orange II	100	
	Poly-B	93	9
	Poly-R	80	5
	RBBR	93	9

Fonte: ALMEIDA, 2017

## **CAPÍTULO VII – PROPOSTA DE UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL**

### **VII.1 Legislação Ambiental**

O conhecimento da natureza de um efluente é essencial para o desenvolvimento do projeto e da operação de uma planta de tratamento. Além disso, deve estar de acordo com os limites permitidos pela legislação ambiental vigente. As leis ambientais são estabelecidas em primeira instância pela União e, na sequência, pelos estados e municípios, que buscam o aperfeiçoamento dessas de acordo com as características e necessidades de cada região. No Brasil, a legislação federal vigente é a Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Já no Estado do Rio de Janeiro tem-se a Norma Técnica NT-202.R-10 do Instituto Estadual do Ambiente (INEA) que estabelece os critérios e padrões para lançamento de efluentes líquidos (ALMEIDA, 2017). A Tabela IX expõe uma comparação entre as normas vigentes para o estado do Rio de Janeiro. Note-se que a resolução mais restritiva deve ser a adotada para cada parâmetro, de modo que a legislação ambiental seja plenamente cumprida.

É preciso se ressaltar que ambas as legislações impõem uma restrição de cor para os efluentes, exigindo que a coloração seja imperceptível pela visão humana. Como os efluentes só podem ser lançados nos corpos de água após o devido tratamento, obedecendo às exigências da lei, não podendo causar efeitos tóxicos, a adequação dos efluentes têxteis às normas vigentes de legislação ambiental é um desafio às empresas, já que o tratamento terciário é normalmente oneroso ou produz rejeitos sólidos tóxicos.

Tabela IX: Comparativo entre os padrões de lançamento de efluentes (ALMEIDA, 2017).

<b>Parâmetros</b>	<b>Unidade</b>	<b>Resolução CONAMA n° 430/11</b>	<b>INEA NT-202.R-10</b>
pH	-	Entre 5 e 9	Entre 5 e 9
Temperatura	°C	Inferior a 40	Inferior a 40
Materiais Sedimentáveis	ml/l	1,0	1,0
Óleos Minerais	mg/l	Até 20,0	Até 20,0
Óleos Vegetais e Gorduras Animais	mg/l	Até 50,0	Até 30,0
Materiais Flutuantes	-	Ausência	Ausência
Alumínio Total	mg/l	-	3,0
Arsênio Total	mg/l	0,5	0,1
Bário Total	mg/l	5,0	5,0
Boro Total	mg/l	5,0	5,0
Cádmio Total	mg/l	0,2	0,1
Chumbo Total	mg/l	0,5	0,5
Cianeto Total	mg/l	1,0	-
Cianeto Livre	mg/l	0,2	0,2
Cobalto Total	mg/l	-	1,0
Cobre Dissolvido	mg/l	1,0	0,5
Cromo Hexavalente	mg/l	0,1	-
Cromo Trivalente	mg/l	1,0	-
Cromo Total	mg/l	-	0,5
Estanho Total	mg/l	4,0	4,0
Ferro Dissolvido	mg/l	15,0	15,0
Fluoreto Total	mg/l	10,0	10,0
Manganês Dissolvido	mg/l	1,0	1,0
Mercúrio Total	mg/l	0,01	0,01
Níquel Total	mg/l	2,0	1,0
Nitrogênio Amoniacal Total	mg/l	20,0	-
Prata Total	mg/l	0,1	0,1

Selênio Total	mg/l	0,3	0,05
Sulfeto	mg/l	1,0	1,0
Sulfito	mg/l	-	1,0
Vanádio Total	mg/l	-	4,0
Zinco Total	mg/l	5,0	1,0
Benzeno	mg/l	1,2	-
Cloro Ativo	mg/l	-	5,0
Clorofórmio	mg/l	1,0	-
Dicloroetano	mg/l	1,0	-
Estireno	mg/l	0,07	-
Etilbenzeno	mg/l	0,84	-
Fenóis Totais	1,0	-	0,2
Tetracloroeto de Carbono	1,2	-	-
Tricloroetano	1,6	-	-
Tolueno	mg/l		
Xileno	mg/l		

---

## VII.2 Tratamento terciário proposto

Neste trabalho foi realizada a degradação de corantes têxteis à partir de fungos filamentosos isolados da floresta de Itatiaia e na segunda etapa do projeto foi realizada a fermentação submersa e uma nova técnica para observar a degradação de tais compostos aromáticos pelas enzimas produzidas pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7. A utilização da linhagem *Penicillium* sp. I13-7 no tratamento de efluentes industriais poderia ser realizada de diversas formas. Neste trabalho será abordada brevemente uma utilização industrial, supondo a utilização de um leito fixo com as suas enzimas imobilizadas. Para isto, será seguida a relação proposta por Headon & Walsh, 1994, descrita na Figura VII-I:

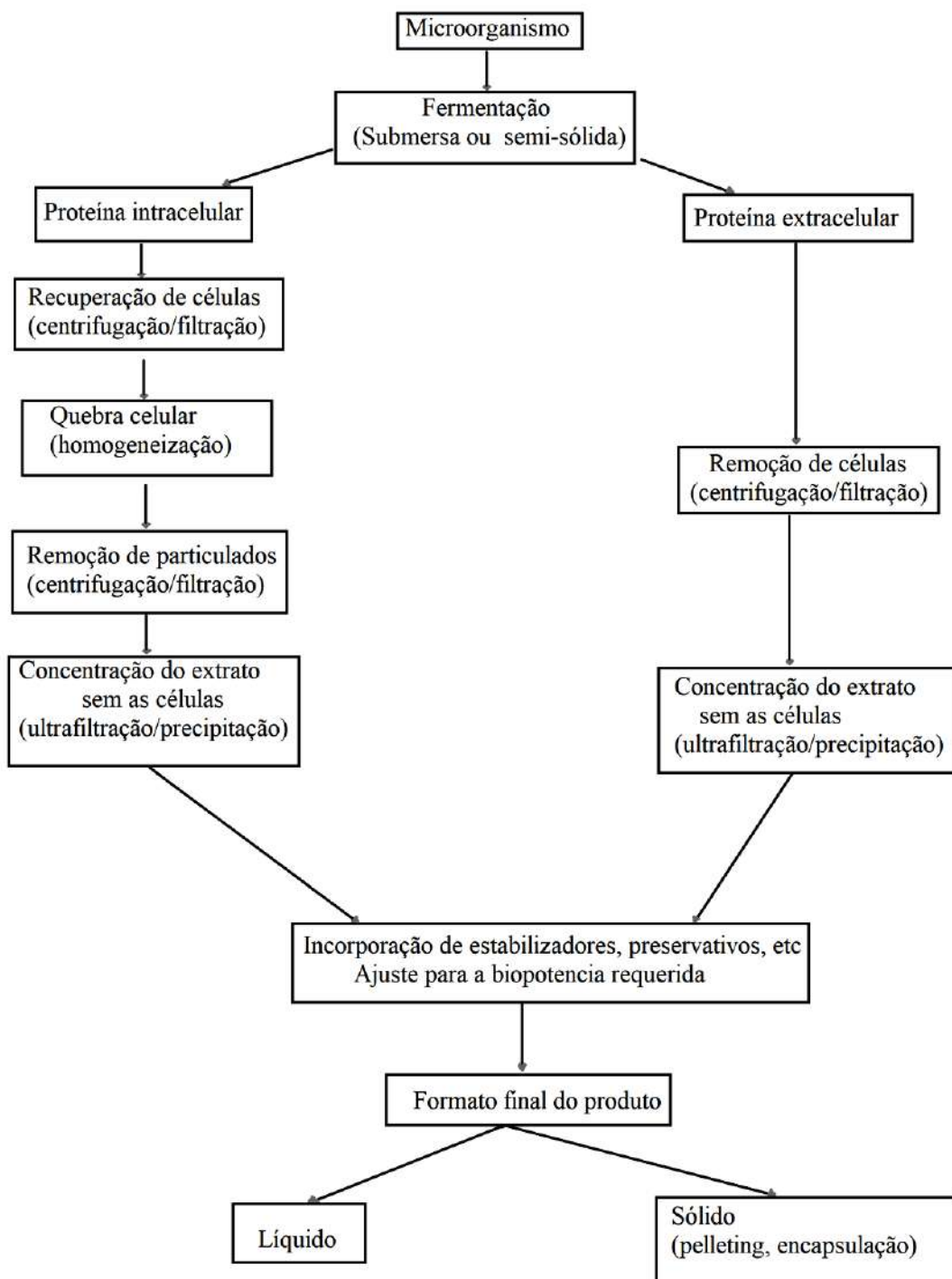


Figura VII-1: Esquema da produção industrial de enzimas à partir de microorganismos (Adaptado de Headon & Walsh, 1994).

A quantidade de processos downstream é dependente da aplicação do produto, mas como nosso produto são as enzimas que vão ser utilizadas em um processo de tratamento de efluentes, elas não necessitam de uma grande purificação, como seria necessário caso elas fossem utilizadas em processos que envolvessem fármacos ou alimentos.

É importante que se destaque que para a utilização de um microrganismo na indústria normalmente deve-se provar que o mesmo é seguro, sendo necessária a sua inclusão na lista Generally Recognized as Safe (GRAS). Para isto, deve-se provar que o microorganismo não é patogênico e tóxico (HEADON & WALSH, 1994).

Como já foi comprovado anteriormente no trabalho que as enzimas extracelulares produzidas pela linhagem promovem a degradação dos corantes testados, a rota da direita será utilizada, por ser uma rota que tem um menor custo operacional e que consiste em uma menor quantidade de operações unitárias. Note-se que embora esta rota vá ser a proposta neste projeto, seria necessário anteriormente realizar-se uma avaliação econômica complexa para verificar se a utilização das enzimas intracelulares seria mais vantajosa economicamente do que a utilização somente das enzimas extracelulares.

Dito isto, para a produção das enzimas seria interessante realizar uma fermentação submersa ao invés de um sistema semi-sólido de fermentação, já que a fermentação submersa já foi testada, além de ser normalmente mais viável economicamente que a outra. Em seguida, deverá ser realizada uma remoção das células através de uma centrifugação e posteriormente será realizada uma ultrafiltração para a purificação das enzimas, conforme Figura VII-II.

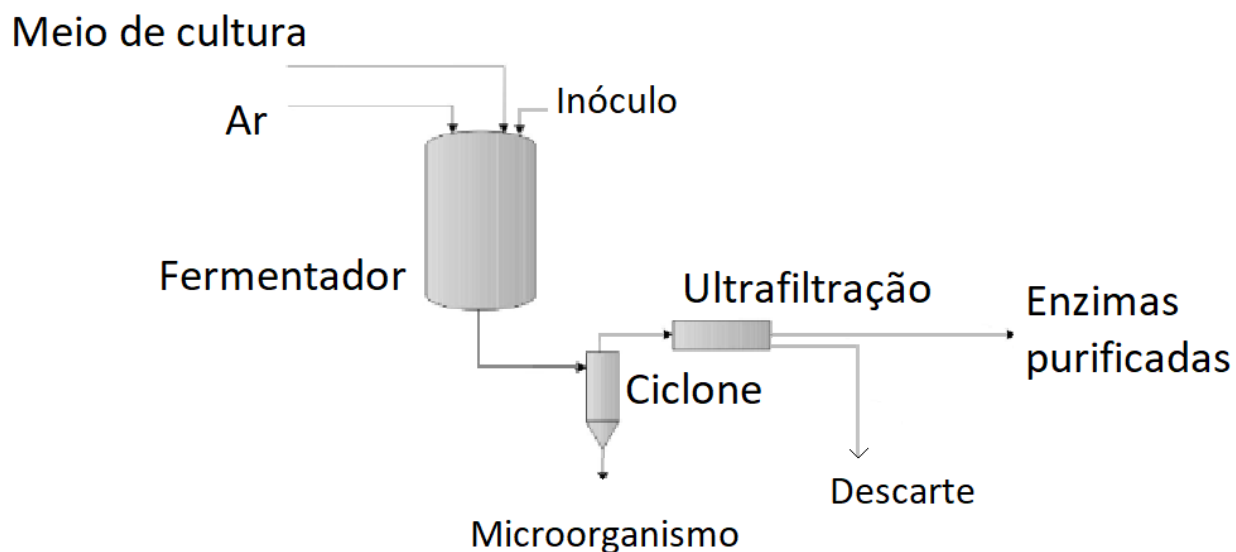


Figura VII-II: Sistema de produção e purificação das enzimas.

Estas enzimas serão fixadas em um leito fixo composto de sílica mesoporosa (MPS), para que as enzimas fiquem fixas no suporte quando se procede a reação de degradação dos corantes. A escolha da sílica mesoporosa como composto de fixação se deve ao seu tamanho de poros e sua estrutura, o que permite um bom agregamento das partículas, além de disponibilizar uma extensa área superficial – permitindo assim que uma significativa quantidade de partículas fiquem imobilizadas. Na Figura VII-III pode-se observar como ocorre a fixação das enzimas no MPS. Sabe-se ainda que a imobilização das enzimas pode fazer com que seja gerado um microambiente em que o confinamento das partículas pode aumentar a seletividade do substrato e a sua atividade (GUSTAFSSON HANNA, 2013). A escolha da estratégia de imobilização necessitaria de um melhor conhecimento das enzimas em questão e foge ao escopo do presente trabalho.



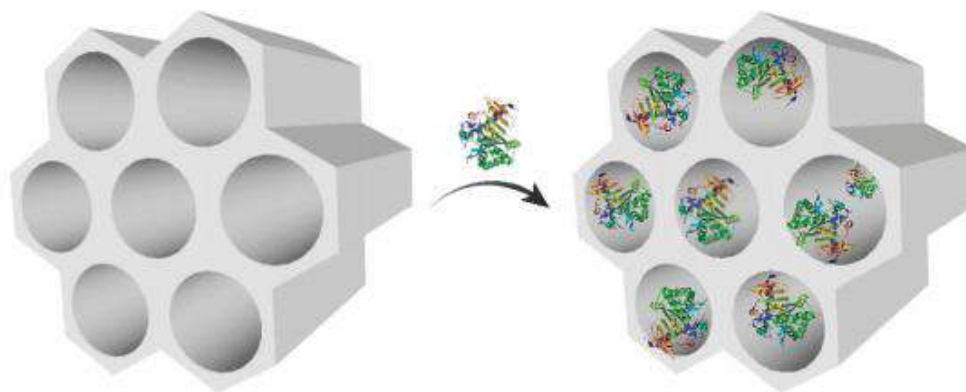


Figura VII-III: Imobilização de enzimas em MPS ( GUSTAFSSON, 2013).

Finalmente, o MPS com as enzimas imobilizadas poderia ser utilizado em um sistema de leito fixo para o tratamento do efluente têxtil, conforme a Figura VII-IV. Este tratamento deve ser realizado em uma etapa posterior ao tratamento por lodo ativado nas indústrias têxteis, fato que será explicado no próximo parágrafo.

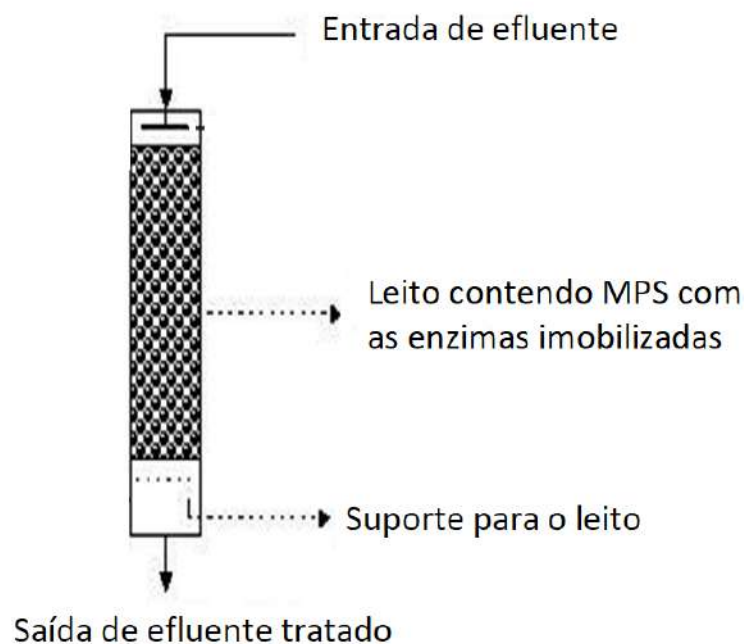


Figura VII-IV: Leito fixo contendo MPS com as enzimas imobilizadas.

Uma vez que habitualmente o tratamento de efluentes nas indústrias têxteis segue o fluxograma presente na Figura VII-V, a escolha do tratamento com as enzimas imobilizadas ser efetuado após o tratamento com lodo ativado se deve ao fato de que ao final do processo ainda estão presentes aproximadamente 30% do corante inicialmente presente no efluente, o que faz com que ocorra uma coloração residual, principalmente quando são empregados corantes reativos (TEREZINHA, 2000; KADAM *et al.*, 2011).

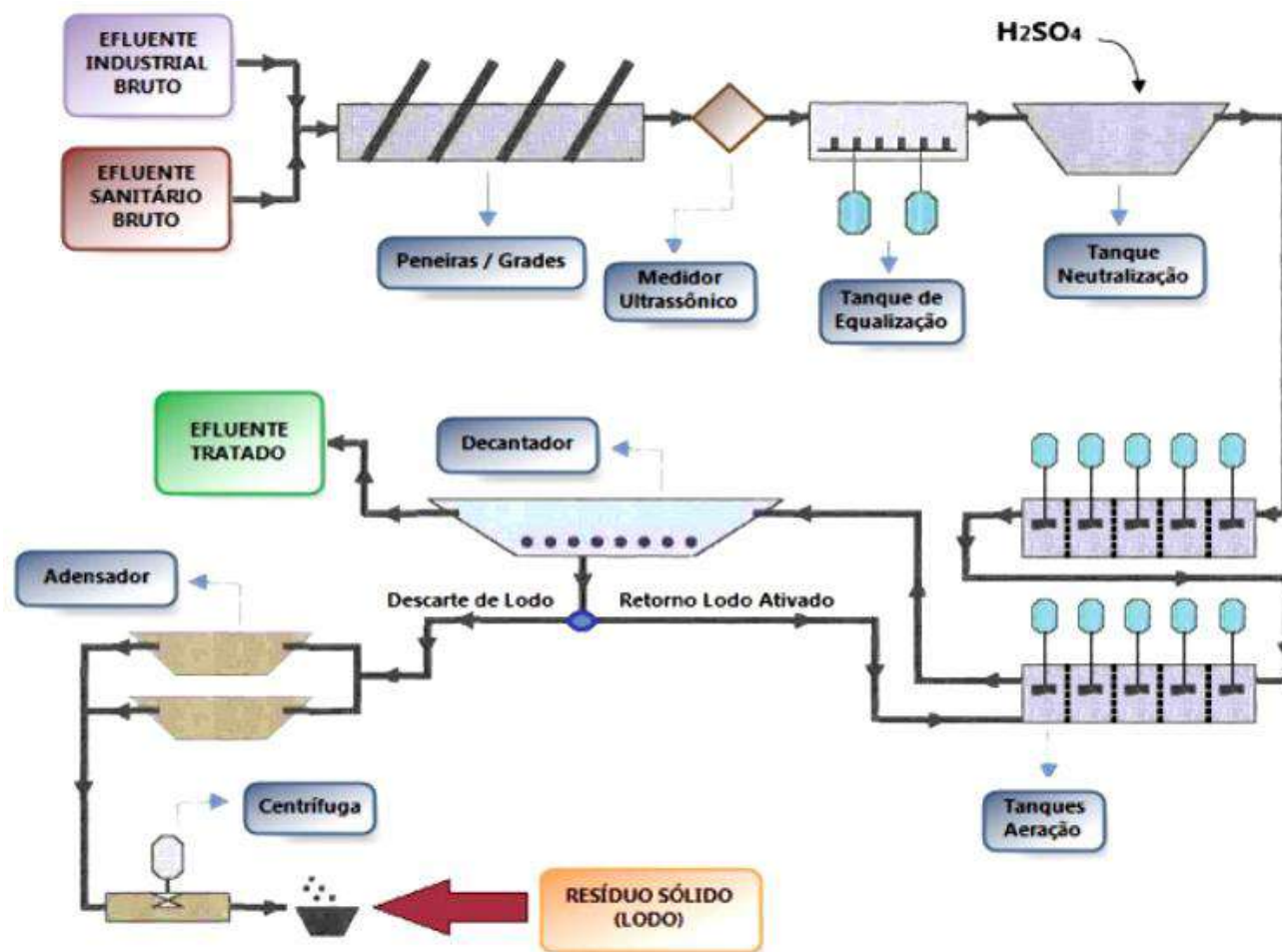


Figura VII-V: Tratamento de efluente em indústrias têxteis (Federação das indústrias do estado de Minas Gerais, 2014).

Finalmente, como a remoção da cor do efluente têxtil é um dos maiores problemas enfrentados pelo setor têxtil – especialmente no que concerne aos corantes reativos – e o tratamento realizado pela linhagem *Penicillium* sp. I13-7 se provou eficaz na remoção da

coloração do corante RB-5, um corante reativo, é provável que a utilização das suas enzimas imobilizadas se prove eficaz na remoção da coloração residual presente no efluente.

O fluxograma contendo todas as etapas presentes no tratamento de efluentes da indústria têxtil, incluindo a etapa proposta, está exposto a seguir, na Figura VII-VI.

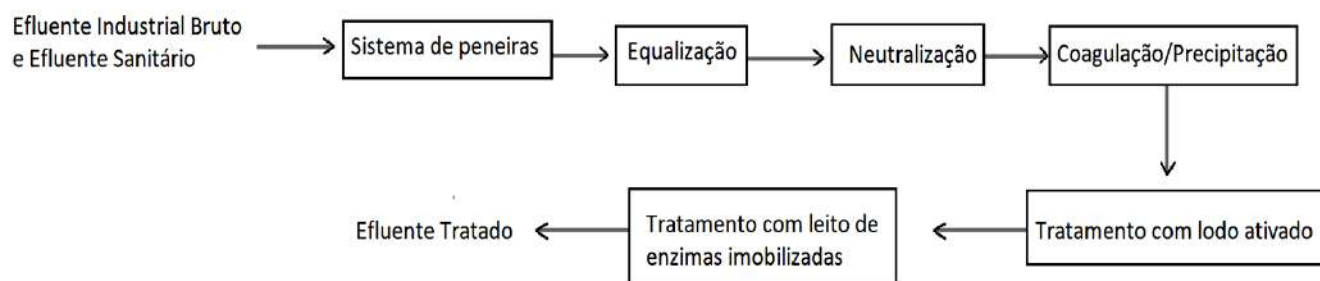


Figura VII-VI: Proposta de tratamento de efluentes para a indústria têxtil.

A primeira etapa de pré-tratamento corresponde a um sistema de gradeamento com o objetivo de efetuar a remoção de restos de tecidos mais grosseiros que podem atrapalhar as etapas posteriores de tratamento, obstruindo tubulações e prejudicando o sistema de bombeamento (FIEMG, 2014).

As grades podem ser de ferro ou de aço, dependendo da ação corrosiva do efluente, com limpeza manual ou mecanizada. Hart (1994) não considera necessária a limpeza mecanizada para a indústria têxtil porque sólidos grosseiros não são abundantes e podem ser retirados manualmente em intervalos de um dia. Além disso, recomenda um gradeamento fino cujo espaçamento entre as barras varie entre 0,5 e 2 cm.

Como, em geral, os efluentes têxteis apresentam uma elevada alcalinidade oriunda da grande quantidade de alcalinizantes utilizadas na fixação dos corantes, faz-se necessária a correção do pH com adição de ácido sulfúrico (BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

Na correção de pH existe outro fator importante a ser considerado que é o pH do meio, que pode afetar a atividade e estabilidade das enzimas biológicas. Segundo Swamy e Ramsay (1999), a ação das enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos é melhor em pH 5,0. Esse fato é corroborado por Soares (2000) – ao destacar que a maioria das lacases isoladas atua em zonas ácidas – e por Pereira e colaboradores (2011) em seus estudos com descoloração de corante e efluente têxtil por fungos. Sendo assim, como a maior parte das enzimas extracelulares são produzidas em maiores quantidades em condições próximas do pH ótimo da sua atividade, considera-se adequado que seja mantido um pH entre 4,5 e 6,0 para uma maior produção dessas enzimas.

Em seguida, o efluente é enviado a um tanque de equalização com a finalidade de homogeneizar o efluente para que se atinjam as condições ótimas para os processos de tratamento subsequentes (CAMMAROTA, 2011).

A implantação de um tanque de equalização se justifica por diversas razões, como a minimização de problemas operacionais causados pela variação das características do efluente e de choques causados por sobrecargas no sistema, diluição de substâncias inibidoras e estabilização de temperatura e pH, melhorando a qualidade final do efluente tratado (ALMEIDA, 2017).

O efluente segue, então, para a etapa de tratamento físico-químico no tanque de coagulação/floculação. Esse tipo de tratamento visa à remoção de material coloidal e partículas muito finas, com diâmetro na faixa de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$ , que sedimentam muito lentamente, eliminando assim parte dos sólidos dissolvidos e sólidos em suspensão presentes no efluente.

A escolha do coagulante irá depender da natureza das águas a serem tratadas, do custo e da facilidade de aquisição. A sua dosagem bem como o pH adequado para máxima coagulação/floculação devem ser determinados em laboratório através do ensaio de Jar Test.

O tratamento com lodo ativado deverá ser realizado para se remover a matéria orgânica presente no efluente, além de diminuir consideravelmente a presença de substâncias tóxicas complexas no meio, que serão tratadas e imobilizadas no lodo sólido.

Por fim, após separação da biomassa fúngica, tem-se então o efluente semi-tratado, que deverá ser tratado na torre contendo enzimas imobilizadas, para promover a remoção final da

coloração do efluente. O efluente tratado deverá então ser avaliado quanto aos parâmetros impostos pela legislação ambiental.

É importante frisar que ainda é necessário, uma caracterização detalhada dos intermediários e metabólitos produzidos durante a biodegradação do efluente utilizando-se as enzimas imobilizadas, para se confirmar o verdadeiro potencial dessa técnica.

Apesar deste processo ser capaz de transformar a molécula de corante em um componente menos complexo, a hipótese de geração de metabólitos intermediários ainda mais tóxicos que a molécula original não deve ser descartada.

Mesmo sem a etapa proposta de tratamento com as enzimas imobilizadas, há a necessidade de se realizar testes de toxicidade antes e depois do tratamento devido à possibilidade de geração de compostos orgânicos tóxicos durante o processamento, caso haja algum problema na planta (KUNZ et al., 2002).

## CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES

Após obtenção dos resultados a partir das metodologias traçadas para atingir os objetivos pre-determinados, pode-se concluir que todos os objetivos foram atingidos.

- O isolamento dos microorganismos a partir das amostras de solo e serapilheira permitiu a coleta de 69 linhagens fúngicas diferentes, as quais foram identificadas parcialmente e conservadas pelo método de Castellani. A maioria dos fungos que foram classificados como possuindo uma forte degradação dos corantes testados foi identificada. Infelizmente algumas linhagens não puderam ser identificadas, por ausência de ferramentas taxonômicas que permitissem tal identificação;

- O *screening* das 69 linhagens de fungos filamentosos em meio ágar malte suplementado com 3 corantes diferentes para avaliar o potencial biotecnológico dos fungos permitiu a seleção de 2 linhagens promissoras, *Penicillium* sp. I13-7 e *Trichoderma* sp. I10-8, para a degradação de corantes têxteis testados;

- As linhagens pré-selecionadas *Trichoderma* sp. I10-8 e *Penicillium* sp. I13-7 foram testadas no sistema submerso para os corantes RR-120, RB-5 e DY-27, com destaque para a linhagem *Penicillium* sp. I13-7, que após 7 dias de fermentação submersa, promoveu uma descoloração de 100% do corante RB-5;

- Para testar o potencial de degradação dos corantes pelas enzimas extracelulares produzidas pelos fungos filamentosos a fim de evitar a produção de substâncias cromóforas pelos fungos durante a fermentação foi realizada a fermentação sem a suplementação do corante por 14 dias para a linhagem *Penicillium* sp. I13-7. Utilizando o meio fermentado por esta linhagem, foram adicionados os corantes previamente testados, observando-se como estes corantes se comportariam na presença apenas das enzimas extracelulares produzidas. Pôde-se confirmar que o escurecimento na presença do DY-27 era causado pela ação das enzimas extracelulares e, comprovou-se uma degradação de 76,7% do corante RR-120 que não pôde ser observada devido à geração de intermediários na fermentação submersa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONVECÇÃO. Diversos subitens. Disponível em : <www.abit.org.br> Acesso em: 18 julho de 2018.
- ADNAN, L.A., MOHD YUSOFF, A.R., HADIBARATA, T. et al. Biodegradation of bis-azo dye Reactive Black 5 by white-rot fungus *Trametes gibbosa* sp. WRF3 and its metabolite characterization. *Water Air Soil Pollut*, V.225, P.2119, 2014.
- ALMEIDA, A. P., Descoloração de corantes têxteis por *Phanerochaete chrysosporium* por sistema submerso. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 2018.
- ALMEIDA, A. P., Proposta de tratamento biológico utilizando fungos para degradação de corantes em efluentes têxteis. Monografia em Engenharia Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 2017.
- ARAÚJO, G. R.; BEZERRA, J. D. P.; FREIRE, K. T. L. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA, C. M.M.; Malosso, E.; SILVA, D. C. V. Descoloração do corante têxtil índigo carmine por espécie de *Aspergillus*. Resumos expandidos I CONICBIO/II CONICBIO/VI SIMCBIO, V.2, 2013.
- ARO, N.; PAKULA, T. & PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*., V.29, P.719–739, 2005.
- ASGHAR, A.; AZIZ, A. A. R.; MOHD, W. A. W. D. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review, *Journal of Cleaner Production*, V.87 , P.826-838, 2015.
- ATKINS, PETER ; JONES, LORETTA. Livro Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente. Bookman. V.5, 2012.
- BALAN, D.S.L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis: Corante índico. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

BALDRIAN, P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil Environ.*, V.55, P.370–378, 2009.

BARBOSA, L. A Indústria Têxtil e de Confecções no Brasil e no Mundo. Brasil Têxtil, Projotex - Projetos e Assessorias Têxteis LTDA. Recife, 2013.

BARRETO, N.S.E. Descoloração e Detoxificação do Azo Corante Alaranjado II por *Geobacillus Stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P fluorescens* Isolados e em Cultura Mista. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Recife, Brasil, 2006.

BARRETO, W. J.; BERNARDINO, D.N.; AFONSO, R.; DOI, S.M.O. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético. *Química Nova*, V.34, n.4, P.568-572, 2011.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R. Estudo de fungos da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em Manaus (AM) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade em Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

BHAGOBATY, R. K. & JOSHI, S. R. Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forests of Meghalaya, Índia. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, V.17, P.33-40, 2012.

BONUGLI-SANTOS, C. R. Fungos Isolados de macro-organismos marinhos brasileiros: Diversidade genética e potencial biotecnológico. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. Manual de tratamento de águas residuárias industriais. 18 ed., São Paulo: CETESB. 1993.

BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; NETO, A.L.O.N.; BATTISTI, A.; PATERNIANI, J.E. S.; PALEGRINI, R.T. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. IV Fórum de Estudos Contábeis, 2004.



BUGG, T. DH.; AHMAD M.; HARDIMAN E. M.; SINGH R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation, *Current Opinion in Biotechnology*, V.22, Issue 3, P.394-400, 2011.

BYBERG R., COBB J.; DIEZ MARTIN L.; THOMPSON R.W.; CAMESANO T.A.; ZAHRAA O., PONS M.N. Comparison of photocatalytic degradation of dyes in relation to their structure. *Environmental science and pollution research*. V.20, P.3570-3581, 2013.

CAMMAROTA, M. C. EQB-485 Engenharia do Meio Ambiente. Notas de aula – Tratamento de efluentes líquidos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

CARDOSO, G. DE BRITO. Avaliação de Diferentes Tratamentos de Efluente Têxtil Simulado Contendo o Azocorante Preto de Diresul. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos. Tiradentes, Brasil, 2010.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V.42, P.225-226, 1939.

CATHRINE, S.J. & RAGHUKUMAR, C. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. *Mycol Res.*, V.113, P.100-109, 2008.

CHUNXIA WANG, AYFER YEDILER, DORIS LIENERT, ZIJIAN WANG, ANTONIUS KETTRUP. Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere*, V.52, Issue 7, P.1225-1232, 2003.

DAMAZIO, M.N.R.; MAGDALENA, C.G. Degradação de corantes por Fungos Filamentosos isolados do Parque Nacional de Itatiaia. Monografia apresentada para obtenção do título de Engenheiro de Bioprocessos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

DINIZ, G. F. D. Emprego de Fungos na Descoloração e Redução da Toxicidade de Corantes Têxteis. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau de Engenharia Agrônoma. Sete Lagoas. 2015.

DONNA TRELLA D'SOUZA, RAKESH TIWARI, AWDHESH KUMAR SAH, CHANDRALATA RAGHUKUMAR. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, V.38, Issues 3–4 ,P.504-511, 2006.

DORUK ARACAGÖK, Y & CIHANGIR, NILÜFER. Decolorization of Reactive Black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. *American Journal of Microbiological Research*, V.1, P.16-20, 2013.

EISENMAN, HELENE C. & CASADEVALL, ARTURO. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.93, P.931-940, 2012.

EMRAH A. E.; ÜNYAYAR A.; KUMBUR H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process, *In Process Biochemistry*, V.42, Issue 10, P. 1429-1435, 2007.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS E FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. *Guia Técnico Ambiental da Indústria Têxtil*. 2014.

FEIFANG ZHANG, AYFER YEDILER, XINMIAO LIANG. Decomposition pathways and reaction intermediate formation of the purified, hydrolyzed azo reactive dye C.I. Reactive Red 120 during ozonation. *Chemosphere*, V.67, P.712-717, 2007.

FIEMG. Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais e Fundação Estadual do Meio Ambiente. *Guia Técnico Ambiental da Indústria Têxtil*. 2014. Disponível em: <<http://www.feam.br>. Acesso em: 20 nov 2016.

GADD, G.M. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters*, V.9, P.237-240, 1980.

GARCÍA-MONTAÑO, J.; DOMÈNECH, X.; GARCÍA-HORTAL, J. A.; TORRADES, F.; PERAL, J.; J. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético. *Química Nova*, V.154, P.484, 2008.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova*, São Paulo, V. 23, n. 1, P. 71-78, 2000.

GUSTAFSSON HANNA, Enzyme Immobilization in Mesoporous Silica, tese para a obtenção do grau de doutor, Departamento de Engenharia Química e Biológica, Chalmers University of Technology, 2013.

HADIBARATA, T., ADNAN, L.A., YUSOFF, A.R.M. et al. Microbial decolorization of an Azo Dye Reactive Black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032. *Water Air Soil Pollut*, V.224, P. 1595, 2013.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate?. *Biodiversity and Conservation*, V.21, P.2425–2433, 2012.

HAO, O.J.; KIM, H. & CHANG, P.C. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, V.30, P. 449-505, 2000.

HARSHAD S. L.; TATOBA R. W.; AVINASH A. K.; SANJAY P. GOVINDWAR, Enhanced biodegradation and detoxification of dispersed azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium, *International Biodeterioration & Biodegradation*, V.72, P. 94-107, 2012.

HART, E. Reciclagem de água, um programa economicamente viável e tecnicamente inovativo. *Tecnologia Meio Ambiente. Química Têxtil*, v. 1, p. 07-10. 1994.

HASSEMER, M. E. N. SENS, M. L. Tratamento do Efluente de uma Indústria Têxtil. *Processo Físico-Químico com Ozônio e Coagulação/ Floculação*. Engenharia Sanitária e Ambiental, Brasil, v. 7. 2002.

HEADON D. R.; WALSH G., The industrial production of enzymes, *Biotechnology Advances*, V.12, P.635-646, 1994.

HONG SODANEATH, JUNG-IN LEE, SEUNG-OK YANG, HYEKYENG JUNG, HEE WOOK RYU & KYUNG-SUK CHO: Decolorization of textile dyes in an air-lift bioreactor inoculated with *Bjerkandera adusta* OBR105, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, V.52, Issue 11, P. 1099-1111, 2017.

KADAM, A. A. TELKE, A. A. JAGTAP, S. S.; GOVINDWAR, S. P. Decolorization of adsorbed textile dyes by developed consortium of *Pseudomonas sp.* SUK1 and *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 under solid state fermentation. *J. Hazard. Mater.* 189, 486-494, 2011.

KALPANA, D.; NATARANJAN, V.; SHIM, J.H.; OH, B.T.; SENTHIL, K. & LEE, Y.S. Biodecolorization and biodegradation of reactive Levafix Blue E-RA granulate dye by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *J Environ Manage.* V.111, P.142-149, 2012.

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova*, V. 28, n.4, P. 629-632, 2005.

KEANE, Jodie. TE VELDE, Dirk Willem. The role of textile and clothing industries in growth and development strategies. Overseas Development Institute, 2008.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, p. 78-82. 2002.

LACHANCE M-A. Yeast biodiversity: how many and how much? In: Péter G, Rosa C (eds). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts. The yeast handbook*. P. 1–9, 2006.

LAURITO-FRIEND, D. F., MENDES, F. M., REINOSO, F. M., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. F. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. *Biomass and Bioenergy* V.75, P.65-74, 2015.

LEVIN L.; MELIGNANI E.; ARACELI M. R. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates, *Bioresource Technology*, V.101, Issue 12, P.4554-4563, 2010.

MACEDO, E. R. Fotofísica Das Rodaminas B E 6g: Processos Fotocalíticos e de Engrandecimento da Fluorescência. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais. Univerdidade Federal do Vale do São Francisco. Bahia, Brasil. 2012.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H. E STAHL, D. A. Microbiologia de Brock – 14<sup>a</sup> Edição. Artmed Editora, 2016.

MANOJ GIRI, NEENA JAGGI, JAWAHAR LAL, NAFA SINGH, RAJ MANGAL PRASAD JAISWAL, KUMUD BANDHU MISHRA, RAM GOPAL. Spectroscopic studies of fluorescent azo dye Direct-Yellow 27 in aqueous solutions. Atti della Fondazione Giorgio Ronchi. V.2, 2010

MAYER, M. A. & STAPLES, C. R. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry V.60, P.551–565, 2002.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Microbiologia Ambiental, Estratégias de isolamentos de micro-organismos envolvidos na degradação de xenobióticos. Embrapa Meio Ambiente, V.2, P.647, 2008.

MIQUELANTE, F. A. Prospecção de fungos filamentosos halotolerantes para uso na descoloração de corantes têxteis. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Pós-Graduação em Ciências –Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.

NONDESTRUCTIVE TESTING (NDT) EDUCATION RESOURCE CENTER, Iowa State University, <https://www.nde-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/PenetrantTest/Introduction/lightresponse.htm> , 2014, site visitado em 15 de julho de 2018.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N. ; SILVA MANUELA DA; SETTE L.D.; Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. MARINE POLLUTION BULLETIN, V62, P.364-370, 2011.

PEREIRA, A.R.B.; BUENO, F.L.; SANTOS, S.C.; LIMA, C.A.A.; DIAS, A.L.T. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. HOLOS Environment, V.10, P.167-173, 2010.

PEREIRA, A. R. B. et al. Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos. *Holos Environment*, Rio Claro, v. 10, n. 2, p. 165-179, 2011.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. *Química Têxtil*, V. 21, P. 73-80, 1998.

POINTING, S.B.; BUSWELL, J.A.; GARETH JONES, E.B. & VRIJMOED, L. L. P. Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. *Mycol. Res.*, V.103, P.696-700. 1999.

POINTING S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 57, P.20-33, 2001.

ROBERTO LIMA DE SOUZA, CLAUDIO. Degradação de corantes reativos e remediação de efluentes têxteis por processos avançados envolvendo ferro metálico. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre Química Analítica. Curitiba, Brasil. 2006.

ROMERO, S.; BLÁNQUEZ, P.; CAMINAL, G.; FONT, X.; SARRÀ, M.; GABARREL, X.; VICENT, T.; Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, V.38, P.2166-2172, 2004.

ROSA, R.; MESSIAS, R. & AMBROZINI, B.; Importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos para o desenvolvimento sustentável. São Carlos. 2003.

R. VELMURUGAN, M. SWAMINATHAN. An efficient nanostructured ZnO for dye sensitized degradation of Reactive Red 120 dye under solar light. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, V.95, Issue 3, P.942-950, 2011.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* V.27, Issue 2, P.185-194. 2009.

SANTOS, G. C. Biossorção e Biodegradação de Azo Corante – Desenvolvimento de Processos Utilizando Resíduos Como Fonte de Micro-organismos. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Rio Claro, 2015.

SARAYU, K. & SANDHYA, S. Current Technologies for Biological Treatment of Textile wastewater – a review. *Applied Biochemistry Biotechnology*, V.167, Issue 3, P.645-661,2012

SHEDBALKAR, U.; DHANVE, R.; JADHAV, J.; J. Hazard. Mater., 157, 472, 2008. SOUZA, C.R.L.; ZAMORA, P.P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. *Química Nova*, V. 28, n.2, P.226-228, 2005.

SING-LAI L.; WAN-LOY C.; SIEW-MOI P., Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater, *Bioresource Technology*,V.101, Issue 19, P.7314-7322, 2010.

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

SPONZA, D. T.; ISIK, M.; Decolorization and inhibition kinetic of Direct Black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, V.34, P.147-158, 2004.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of White rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, London, v. 24, n. 3, p. 130-137. 1999.

TEREZINHA C.B. LEOCÁDIA, Caracterização de efluente têxtil e proposta de tratamento. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, UFRN, 2000.

TORRES, J.M.O.; CARDENOS, C. V.; MORON, L.S.; GUZMAN, A.P.A. & DELA CRUZ, T. E. E. Dye Decolorization Activities of Marine-Derived Fungi Isolated from Manila Bay and Calatagan Bay, Philippines. *Philipp. J. Sci.* , V.140, P.133-143, 2011.

TWARDOKUS, ROLF GUENTER. Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Florianópolis, Brasil. 2004.

URAIRUJ, C.; KHANONGNUCH, C. & LUMYONG, S. Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae. *Fungal Diversity*, V.13, P.209-219. 2003.

VIJAYKUMAR, M.H.; VEERANAGOUDA, Y.; NEELAKANTESHWAR, K. & KAREGOUDAR, T.B. Decolorization of 1:2 metal complex dye Acid blue 193 by a newly isolated fungus, *Cladosporium cladosporioides*. *Word J Microb Biot.* V.22,P.157–162, 2006.

WERNER MÄNTELE, ERHAN DENIZ. Uv–vis absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, V.173,P.965-968, 2017

WORLD TRADE ORGANIZATION (OMC). Documents, data and resources. Disponível em: <<https://www.wto.org/>>. Acesso em: 12 julho de 2018.

YANG, Q., YANG, M., PRITSCH, K. ET AL. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters*, V.25,Issue 9, P.709-713, 2003.

4-Phenylazophenol. Disponível

em:<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/131083?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 24 maio 2018.