

ANA PAULA SOARES PARANHOS

Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2011

ANA PAULA SOARES PARANHOS

Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA DE MELLO GUGLIOTTA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Paranhos, Ana Paula Soares

P223e Estudos dos compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil / Ana Paula Soares Paranhos -- São Paulo, 2011.

141 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011

Bibliografia.

1. Basidiomicetos. 2. Biodegradação. 3. Fenton. I. Título

CDU: 582.284

Aos meus pais, Ivonete Soares e José Paranhos e minha avó Maria, pelas preciosas lições de vida, carinho, amor e apoio às minhas escolhas.

Dedico

"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma. Tudo depende só de mim."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho.

Primeiramente, agradecer a minha mãe, Ivonete Soares, por todo carinho, amor, dedicação e incentivo. Você é um exemplo de mulher e de mãe, espero um dia ser ao menos metade dessa mulher maravilhosa que você é.

Agradeço ao meu pai, José Paranhos, por todo carinho, amor e atenção. Por sempre ter acreditado no meu potencial, me incentivando incondicionalmente.

Agradeço a Dra. Vera Vitali, por todos os ensinamentos transmitidos nestes 4 anos em que trabalhamos juntas. Obrigada pela paciência que sempre teve comigo (sei que não sou uma pessoa fácil), por me acalmar nos momentos de desespero e pela amizade.

A Dra. Adriana Gugliotta, pela confiança, oportunidade de execução deste trabalho e por todos os conhecimentos e conselhos, sempre oportunos, que me deu ao longo destes 2 anos.

À todo pessoal do laboratório de Micologia aplicada, Marina Bianchini, Luciana Gimenes, Leandro Gonçalves e Jaqueline, por todas contribuições, ajudas, cafézinhos, amizade e por tornar a minha rotina mais prazerosa. Em especial, agradeço ao William Okada e Thiara Bento, por toda a amizade que construímos durante este tempo que trabalhamos juntos e pela incondicional ajuda que vocês me deram. Japa, obrigada por todos os ensinamentos (nem sempre produtivos), momentos de descontração e por existir, pois como você mesmo diz, não sou nada sem você. Thiara, obrigada por toda a força que você sempre me deu, pela confiança que tem no meu trabalho, pelas noites em claro que passou comigo no lab e por ter aguentado o meu mal-humor durante o fechado da dissertação.

Aos amigos Micólogos, Carol Gasch, Maira Cortellini, Ricardo Silva e Nelson Junior pelos ensinamentos, conselhos, ajudas e por toda a preocupação que sempre tiveram comigo. Espelho-me muito em vocês como profissionais!!!

A todos do Núcleo de pesquisa em Micologia, pesquisadores e estagiários que contribuíram de alguma maneira, para meu aprendizado.

Ao Dr. Dácio Matheus por todas as contribuições e pela amizade.

A Dra. Luce Brandão, Dra. Kelly Simões e todo o pessoal do Núcleo de Fisiologia e do Núcleo de Ecologia, pelos empréstimos de equipamentos, ajudas, idéias e conselhos.

Ao pessoal do alojamento do Instituto de Botânica, pela calourosa recepção e todo acolhimento durante a minha estadia. Agradeço as meninas do quarto 6, Daiana Teixeira, Majoi Nascimento, Luanda Soares, Fernanda Garcia, além da agregada Luciane Fontana. Obrigada por passarem noite em claro me ouvindo reclamar, pelos conselhos sempre oportunos, pelo incentivo e por me animarem nos dias de tensão, com jantares divertidíssimos e por acreditarem no meu trabalho. Fê, Argentina mais querida do Brasil, obrigada por me ajudar a desvendar os enigmas sombrios da química. Você foi essencial na finalização deste trabalho!

Agradeço ao Sergio Moreira e Victor Tabosa por todas as ajudas que sempre me deram, pelos conselhos e amizade.

Ao meu namorado, Rene Souza, pelo grande incentivo que me deu, desde o início dessa jornada. Obrigada por todo carinho, amor, paciência e por ser este namorado maravilhoso!

As minhas irmãs, Maris TRISKLE, por toda compreensão, lealdade e amizade. Não tem como descrever aqui a importância de vocês na minha vida!

Ao Murilo Borduqui, amigo de todos os momentos, por todas as conversas, idéias, sugestões e cervejinhas.

A minha família, pela compreensão às minhas inúmeras ausências nos almoços de domingo. Pelo carinho e amor. Sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

A minha avó Maria, por toda a dedicação a nossa família, por todos os sacrifícios já feitos por mim, por minha criação e por todo amor e carinho.

Aos meus tios e tias, que me ajudaram de todas as maneiras possíveis, não medindo esforços para que este trabalho fosse concluído com sucesso. Em especial, Ivanilda Soares, por ter abdicado do seu tempo livre para revisar o meu trabalho.

Aos meus irmãos, primos e sobrinhos postigos por todo carinho e alegria, principalmente aos pequenos (que já não são mais tão pequenos assim) por tornarem todos os meus finais de semana uma festa.

Aos meus amigos, Pedro Sol, Amanda Sol Guimarães, Denise Duarte, Kauê Lemos, Beatriz Almeida, Mari Massarenti, Rafa Pimentel, Guilherme Borin, Feu Borges, Carol Poppe, Ricardo Licciardo (Cipó), Durval e Marília Souza, Fabio Fiorini, Natalia Oliveira, Daniela Melo, Thiago Ducca, Talita Carasini, Paula Lassen, Thais Drummond e Alex Mathias pelo companheirismo, pela amizade, pelos momentos de diversões e risos, e que mesmo não entendendo o que eu faço, escutaram-me inúmeras vezes e ajudaram-me em tudo o que foi possível.

Ao Instituto de Botânica, pela oportunidade e auxílio.

A Capes pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

ÍNDICE

Resumo.....	10
Abstract.....	12
1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica.....	17
2.1 Contaminação hídrica pela indústria têxtil.....	17
2.1.1 Corantes.....	19
2.1.1.1. Corantes reativos.....	21
2.2. Tratamentos.....	23
2.3. Biodegradação da lignina.....	29
2.3.1.Reação de Fenton e biodegradação da lignina.....	30
2.3.1.2. Sistema de Fenton.....	31
2.3.1.3. Fundamentos da reação de Fenton.....	33
2.3.2 CBMM envolvidos na biodegradação da madeira.....	34
2.3.2.1. Ácido oxálico.....	34
2.3.2.2. Peptídeos.....	35
2.3.2.3. Compostos aromáticos quelantes e redutores de Fe ³⁺	36
2.3.2.3.1. Agentes quelantes de Fe ³⁺	39
2.4. Papel dos Fundos basidiomicetos na degradação de compostos recalcitrantes.....	41
2.5. Biodegradação de corantes têxteis por fungos basidiomicetos tropicais.....	44
2.6 Justificativas.....	45
3. Objetivos.....	47
4. Material e Métodos.....	48
4.1 Material Biológico.....	48
4.2. Corantes sintéticos.....	49
4.3. Condição de Cultivo.....	50
4.3.1 Meio basal.....	51
4.3.2. Meio basal modificado.....	51
4.4 Obtenção dos compostos de baixa massa molar.....	51
4.5. Modificação do pH dos CBMM nas diferentes idades fisiológicas.....	51

4.6. Fluxograma das Etapas do projeto.....	52
4.7. Caracterização dos CBMM.....	53
4.7.1. Preparo de vidraria.....	53
4.7.1.1. Método CAS para detecção de atividade de quelantes de Fe^{3+}	53
4.7.1.2. Atividade redutora de Fe^{3+}	54
4.7.2. Caracterização química dos CBMM.....	54
4.7.2.1. Derivados de Catecol.....	54
4.7.2.2. Derivados de ácido hidroxâmico.....	55
4.8. Determinação da degradação in vitro dos corantes reativos têxteis pelos CBMM que contém quelantes de metal.....	55
4.9. Análise estatística dos dados.....	56

CAPÍTULO I

Avaliação da interferência da composição do meio basal na produção de
quelantes de ferro e na descoloração de corantes têxteis

Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e métodos.....	63
Resultados e discussão.....	65
Conclusão.....	72
Referência bibliográficas.....	73

CAPÍTULO II

Caracterização dos compostos de baixa massa molar produzidos por fungos basidiomicetos de podridão branca

Resumo.....	78
Abstract.....	79
Introdução.....	80
Material e métodos.....	82
Resultados e discussão.....	84
Conclusão.....	93
Referência bibliográficas.....	94

CAPÍTULO III

Avaliação do potencial de descoloração dos corantes reativos utilizados nas indústrias têxteis pelos compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos basidiomicetos

Resumo.....	99
Abstract.....	100
Introdução.....	101
Material e métodos.....	105
Resultados e discussão.....	108
Conclusões.....	118
Referência bibliográficas.....	119
Conclusões Gerais.....	124
Referências bibliográficas.....	125

RESUMO

PARANHOS, A. P. S. Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil. 2011. [Dissertação]. São Paulo – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2011.

Fungos basidiomicetos, causadores de podridão branca da madeira, têm a capacidade de transformar e até mineralizar, além da lignina, uma variedade de poluentes orgânicos resistentes à degradação. Entre eles estão os corantes, presentes em todos os efluentes têxteis, conferindo a eles efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos. A degradação desses corantes por fungos basidiomicetos deve-se ao seu complexo enzimático não-específico, formado, principalmente, por enzimas extracelulares e compostos de baixa massa molar, entre os quais os quelantes de ferro. Com o objetivo de conhecer os mecanismos envolvidos na degradação de corantes e sua contribuição na descoloração, neste trabalho foi estudado a composição dos compostos de baixa massa molar produzidos pelos fungos de podridão branca *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 e *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541, quanto ao seu comportamento em pH alcalino e sua capacidade em degradar corantes reativos têxteis (vermelho FN-2BL e azul brilhante H-GR). *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea* foram incubados em meio basal, no escuro, a 25°C, durante 21 dias, sendo que, em períodos de sete e 21 dias, triplicatas foram concentradas e ultrafiltradas (membranas de corte 5 kDa) para obtenção dos compostos de baixa massa molar em diferentes idades fisiológicas. Esses compostos foram caracterizados quanto à produção de quelantes de ferro, tipo de quelante - catecol e/ou hidroxamato, atividade redutora de Fe³⁺ e o potencial de descoloração de corantes reativos em reações com pH do meio e alcalinizado. Ambos os fungos apresentaram produção significativa de quelantes de ferro, caracterizados como tipo Catecol e apresentaram uma baixa atividade redutora de ferro. Para a avaliação do potencial de descoloração desses compostos nas diferentes idades fisiológicas

dos fungos, todas as amostras obtidas foram divididas em dois lotes, cuja metade teve seu pH alterado para 9. Os corantes na concentração de 0,01% foram incubados com os compostos de baixa massa molar 1:1(v/v), durante 72 horas, no escuro, em temperatura ambiente. A descoloração foi monitorada em intervalos de 24 horas por espectrofotometria empregando o comprimento de onda característico de cada corante. Os compostos de baixa massa molar de *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea*, sem alteração do pH, apresentaram descoloração do corante azul brilhante H-GR com 21 dias de incubação (24% e 21%, respectivamente). O corante vermelho FN-2BL não apresentou descoloração pelos CBMM de ambos fungos. Nos compostos em que o pH foi alcalinizado, os quelantes não foram capazes de sequestrar íons férricos em virtude de sua precipitação e não apresentaram descoloração dos corantes reativos. Esses resultados sugerem que o mecanismo de descoloração proporcionado pelos compostos de baixa massa molar deve ser a reação de Fenton, visto a presença dos componentes que permitem essa reação nos compostos de baixa massa molar, a descoloração em pH ácido e sua inibição em pH alcalino.

Palavras-chave: Corantes reativos; Quelantes de ferro; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Reação de Fenton; Descoloração.

ABSTRACT

PARANHOS, A. P. S. Study of low molecular weight compounds iron reducers, produced by basidiomycetes with the potential to decolorize textile dyes. 2011. [Dissertation]. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2011.

White rot fungi have the ability to transform and even mineralize lignin as well as a variety of persistent organic pollutants, including dyes. These compounds, present in all textile effluents, are toxic, carcinogenic and mutagenic. The degradation of dyes by basidiomycetes fungi is possible due to their non-specific enzyme complex, comprised mainly by extracellular enzymes and low molecular weight compounds, including iron chelator. Among the understanding of the mechanisms involved in dye degradation and their role in decolorization, the composition of low molecular weight compounds produced by white rot fungi *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 and *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 was studied, regarding their behavior in alkaline pH and ability to degrade reactive textile dyes (FN-2SB red and brilliant blue H-GR). *Trogia buccinalis* and *Peniophora cinerea* were incubated in basal medium, in the absence of illumination at 25 °C for 21 days. At periods of seven and twenty-one days, triplicates were concentrated and ultrafiltered (5 cutoff kDa membranes) to obtain low molecular weight compounds at different physiological ages. These compounds were characterized by the production of iron chelators, chelating type - catechol and/or hydroxamate, Fe³⁺ reducing activity and the potential for decolorization of reactive dyes in reactions with the medium pH and alkaline. Both fungi showed significant production of iron chelators, characterized as type Catechol, and presented low iron reducing activity. To assess the decolorization potential of these compounds in different physiological ages, all samples were divided into two lots, half of which had the pH changed to 9. The dye concentration of 0.01% were incubated with low molecular weight compounds 1:1 (v / v) for 72 hours in the dark at room temperature. The decolorization was monitored at intervals of 24 hours by

spectrophotometry using the characteristic wavelength of each dye. Low molecular weight compounds produced by *Trogia buccinalis* *Peniophora cinerea*, with unaltered pH, presented decolorization of brilliant blue H-GR with 21 days of incubation (24 % and 21 %, respectively). The red dye FN-2SB wasn't show decolorization for both fungi CBMM. In the compounds where the pH was alkaline, the chelating agents were not able to sequester ferric ions due to their precipitation and showed no decolorization of the reactive dyes. These results suggest that the decolorization mechanism provided by low molecular weight compounds should be the Fenton reaction, whereas the presence of these components permits this reaction in low molecular weight compounds, decolorization at acid pH and its inhibition at alkaline pH.

Keywords: Reactive dyes; iron chelators; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Fenton reaction; decolorization.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as atividades industriais cresceram de maneira desmedida, ocasionando grandes problemas em virtude da eliminação de rejeitos tóxicos, provenientes de subprodutos gerados pelas indústrias. A destinação e eliminação desses rejeitos é, atualmente, um dos mais importantes assuntos em controle de poluição, o que tem levado pesquisadores a buscar novas ferramentas para diminuir ou eliminar a toxicidade dos efluentes gasosos, líquidos e sólidos formados em seus distintos processos, sempre considerando as regulamentações e legislações voltadas à proteção ambiental.

A contaminação de águas naturais é, hoje, um dos grandes problemas da sociedade moderna. Do total de água disponível para consumo mundial, o setor têxtil consome por volta de 15% da água destinada às indústrias, devolvendo-a, depois dos processos, extremamente contaminada (PERES; ABRAHÃO, 1998), as quais podem causar sérios problemas ambientais quando não corretamente tratados (SWAMY; RAMSAY, 1999).

O efluente da indústria têxtil apresenta composição variada, dependendo do tipo de processo, do corante e dos tecidos utilizados, sendo caracterizado por: intensa cor, pH alcalino; elevada temperatura; alta demanda química de oxigênio (DQO) e alta condutividade (GUGLIOTTA, 2001). Os corantes apresentam baixa disponibilidade à biodegradação e resistência à destruição por métodos de tratamentos físico-químicos. A maioria dos corantes usados nas indústrias e seus metabólitos, após tratamento de efluentes, são recalcitrantes ao tratamento biológico, apresentando efeitos tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos (HUNGER; JUNG, 1991).

O uso de basidiomicetos degradadores de lignina tem sido, em particular, extensivamente estudado, visto o enorme potencial desses organismos na degradação de efluentes têxteis, papaleiros e de poluentes como PCF (pentaclorofenol) e bifenilas policloradas, pelo fato de apresentarem alta resistência a condições ambientais adversas (ZHAO; HARDIN, 2007; KAMIDA et al. 2005; OKADA, 2010). Essa tecnologia é limpa, apresenta baixo custo

para seu emprego, além de proporcionar soluções permanentes para o problema de poluição ambiental.

Apesar dos diversos estudos com os fungos basidiomicetos em biorremediação, são escassas as informações sobre os mecanismos químicos e bioquímicos exatos empregados por estes durante o processo de biodegradação da madeira. Contudo, muitos estudos atuais revelam que esse processo não pode ser explicado unicamente com base na ação das diversas enzimas lignocelulolíticas produzidas pelos fungos. Pesquisas recentes têm indicado a participação expressiva dos compostos de baixa massa molar no processo de degradação (ARANTES et al., 2006a; AGUIAR et al., 2007; GOODELL et al., 1997; MACHUCA, 1995).

Acredita-se que os compostos de baixa massa molar são os responsáveis pelo processo inicial de degradação da madeira, por causa de seu baixo peso molar e a capacidade de alguns de quelar Fe^{3+} e reduzi-lo em Fe^{2+} . O Fe^{2+} , na presença de peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) gera radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que, uma vez formado, atua oxidativamente nos constituintes da madeira.

Entretanto, essa teoria é bastante aceita para explicar a degradação da madeira não enzimática de fungos de podridão parda. Pouco se sabe sobre as condições ideais para produção desses compostos redutores de ferro, quais parâmetros ambientais influenciam em sua detecção, qual sua participação na degradação e se esse é um mecanismo exclusivo desse grupo de fungos.

Tendo como base a importância do conhecimento das vias degradativas dos fungos lignolíticos, de seu potencial de aplicação na biorremediação, atuando na degradação de compostos recalcitrantes, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a composição da fração de baixa massa molar de *Peniophora cinerea* e *Trogia buccinalis*, seu comportamento em pH alcalino e sua capacidade em degradar corantes têxteis.

Este estudo faz parte de um projeto interinstitucional intitulado "Biodegradação de Corantes Têxteis por Fungos Basidiomicetos Tropicais", cujo objetivo geral é compreender o mecanismo envolvido na degradação de

corantes têxteis por fungos basidiomicetos como subsídio para aplicação desses fungos e de seu sistema ligninolítico, na redução da cor e da toxicidade de efluentes originados do banho de tingimento de fibras têxteis. As linhagens utilizadas neste trabalho foram selecionadas com base nos bons resultados apresentados na descoloração do corante reativo antraquinônico Azul Brilhante de Remazol R ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), em meio líquido definido em pH entre 5 e 9, e produção de quelantes de ferro de forma qualitativa (MOREIRA-NETO et al., submetido).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação hídrica pela indústria têxtil

A contaminação de águas naturais vem sendo, sem dúvida, um dos grandes problemas da sociedade moderna. Do total de água disponível para consumo mundial, próximo de 88% é utilizada na agricultura. A indústria é responsável por 7%, ficando os restantes 5% para uso doméstico. Da parte industrial, o setor têxtil consome por volta de 15% da água, devolvendo-a depois dos processos, extremamente contaminada (SWAMY; RAMSAY, 1999; PERES; ABRAHÃO, 1998).

O setor têxtil tem um papel relevante na maioria dos países, sendo um dos segmentos industriais de maior tradição. Dentre todos os segmentos, ele é responsável por grande parte da economia dos países desenvolvidos, sendo o carro-chefe nos países emergentes (FORGIARINI, 2006).

Em virtude da grande produção, é significativo o volume de resíduos (sólidos, líquidos e gasosos) gerados por essas empresas, sendo as operações de limpeza, tingimento e acabamento as responsáveis pela formação de grande parte desses efluentes (Tabela 1). Nessas indústrias a água é utilizada como meio de transporte para os produtos químicos do processo, bem como para remoção do excesso daqueles considerados indesejáveis para o fio ou tecido (CAMMAROTA; COELHO, 2001).

O efluente da indústria têxtil apresenta composição variada, dependendo do tipo de processo, do corante e dos tecidos utilizados, sendo, normalmente, caracterizado por: intensa cor gerada pela grande quantidade de corantes não fixados; pH alcalino; elevada temperatura; alta demanda química de oxigênio (DQO) e alta condutividade (ABRAHÃO; SILVA, 2002; GUGLIOTTA, 2001). Nos processos de tingimento e acabamento da produção têxtil ocorre a geração de grandes volumes de efluentes com extensa variedade de produtos químicos, dentre eles os corantes, compostos caracterizados por apresentar baixa disponibilidade à biodegradação e resistência à destruição por métodos

de tratamentos físico-químicos. Alguns problemas envolvendo a classe de corantes reativos como a formação de aminas e outros compostos intermediários com potencialidade carcinogênica, são preocupantes, principalmente considerando-se que esse grupo de corantes constitui um dos mais usados no Brasil para a tintura de algodão (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Tabela 1: Valores prováveis de alguns efluentes líquidos têxteis

Fibra	Processo	pH	DBO(mg/L)	ST(mg/L)	Água(L/Kg)
Algodão	Desengomagem	6-8	1700-5200	16000-	3-9
	Purga	10-13	50-2900	32000	26-43
	Alvejamento	8-10	90-1700	7600-	3-124
	Mercerização	5-9	45-65	17400	232-308
	Tingimento	5-10	11-1800	2300- 14400 600-1900 500-14000	8-300
Poliamida	Purga	9-11	1000-1500	1500-2000	50-70
	Tingimento	6-9	300-400	500-700	15-30
Poliéster	Purga	-	500-800	-	25-40
	Tingimento	-	500-27000	-	15-30
	Purga Final	-	600-750	-	15-30
Viscose	Purga	6-9	2500-3500	3000-3500	15-30
	Tingimento	6-9	2500-3500	3000-3500	15-30

Fonte: FORGIARINI, 2006

Os efluentes têxteis também apresentam alto poder tóxico para a biota aquática, além de causarem eutrofização das águas, alterações na demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e no oxigênio dissolvido, redução da fotossíntese, em virtude da diminuição de entrada de luz na água, diferentes graus de toxicidade, mutagênese e carcinogênese. Quando esses efluentes sofrem reações químicas com outros compostos no meio, seja por carvão ativado ou por tratamentos químicos, ocorre à formação de aminas aromáticas, as quais podem ser mais tóxicas do que o próprio corante inicial, contido no efluente (RODRIGUES, 2003; HUNGER; JUNG, 1991).

2.1.1 Corantes

A importância dos corantes para a civilização humana é evidente e bem documentada. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, representando um consumo anual de cerca de 7×10^5 toneladas no mundo, sendo 26.500 toneladas somente no Brasil (KUNZ et al., 2002). Eles são intensamente empregados na coloração de vários substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, substratos têxteis, etc.

Os corantes são compostos orgânicos caracterizados por apresentarem absorção de luz na região visível do espectro eletromagnético (400 a 700 nm), razão pela qual eles aparecem coloridos. São facilmente detectáveis a olho nu, e visíveis em alguns casos, mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 ppm (1mg/L). Esse comportamento apresenta vantagens e desvantagens, pois uma pequena quantidade lançada de efluentes no ambiente aquático pode causar acentuada mudança de coloração dos rios, mas pode também ser detectada pelo público e autoridades controladores dos assuntos ambientais (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis. Afora a beleza da cor, o consumidor, normalmente, exige algumas características básicas do produto, tais como elevado grau de fixação em relação à luz, lavagem e transpiração, tanto no início quanto após o uso prolongado. Para garantir essas propriedades, as substâncias as quais conferem coloração à fibra devem apresentar alta afinidade, uniformidade na coloração, resistência a agentes desencadeadores do desbotamento e ainda se apresentar viável economicamente (FORGIARINI, 2006).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), no processo de tingimento têxtil se utilizam vários corantes classificados conforme a estrutura química do grupo cromóforo, responsável pela cor ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado na fibra têxtil. De acordo com o modo de fixação, os corantes são classificados como: ácidos, catiônicos ou básicos, diretos ou substantivos, dispersos, reativos, sulfurados (de enxofre) e cuba (Tabela 2).

Tabela 2: Principais grupos de corantes classificados de acordo com o modo de fixação (Cetesb, 2009)

Classe dos corantes	Descrição	Tipo de fibras	Fixação típica(%)	Poluentes associados
Ácidos	Compostos aniônicos solúveis em água	Lã e poliamida	80 – 93	Cor, ácidos orgânicos e corantes não-fixados
Catiônicos ou básicos	Compostos catiônicos, solúveis em água, aplicáveis em banho fracamente ácido	Acrílico e alguns tipos de poliéster	97 – 98	Fixação quase que total na fibra. Sal, ácidos orgânicos, retardantes, dispersantes, etc.
Diretos	Solúveis em água, compostos aniônicos. Podem ser aplicados diretamente na celulose sem mordente (ou metais como cromo e cobre)	Algodão, raíom e demais fibras celulósicas	70 – 95	Cor, sal, corante não-fixado, fixadores; agentes catiônicos surfactantes, antiespumante, agentes retardantes e igualizantes, etc.
Dispersos	Insolúveis em água, Compostos não-iônicos	Poliéster, acetato e outras fibras sintéticas	80 – 90	Cor, ácidos orgânicos, agentes de igualização, fosfatos, antiespumantes, lubrificantes, dispersantes, etc.
Reativos	Compostos aniônicos, classe mais importante de corantes	Algodão, lã e outras fibras celulósicas	60 – 90	Cor, sal, álcalis, corantes hidrolisados, surfactantes, antirredutores orgânicos, antiespumantes, etc.
Sulfurosos (enxofre)	Mercapto corantes. Compostos orgânicos contendo enxofre e polisulfetos em sua formulação	Algodão e outras fibras celulósicas	60 – 70	Cor, sal, álcalis, agentes oxidantes, agentes redutores e corantes não-fixados, etc.
Cuba ou tina	Corantes tipo redox, insolúveis em água. A “mais nobre” classe de corantes	Algodão e outras fibras celulósicas	80 – 95	Cor, álcalis, agentes oxidantes, agentes redutores, etc.

2.1.1.1 Corantes reativos

Essa classe de corantes é muito utilizada no tingimento do algodão e rayon. São caracterizados por apresentar, em sua estrutura, dois grupos funcionais com papéis diferentes: cromóforos, com estruturas azo e antraquinona, e eletrofílicos, com estruturas clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila.

Os grupos eletrofílicos são fixadores dos cromóforos às fibras dos tecidos, com capacidade de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas, e com os grupos amino das fibras poliamidas (CATANHO et al., 2006). O grupo reativo pode ser mono, di ou multireativo, sendo os mais importantes os mono ou diclorotriazininas, vinilsulfônicos, nomofluortriazina (MONTANO, 2007; KIMURA et al., 1999).

O grupo cromóforo que confere a cor ao corante, possui um sistema que pode ser linear ou cíclico com dupla ligação conjugada, além de um ou mais grupos para a solubilização em água, que geralmente são os grupos sulfônicos (Figura 1). Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente nos corantes, mas, sem dúvida, os mais representativos e largamente usados são os da família dos azo corantes, e estes representam, aproximadamente, 80% do total empregado na indústria têxtil e caracterizam-se por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos (MONTANO, 2007; GUARATINI; ZANONI, 2000) (Figura 2).

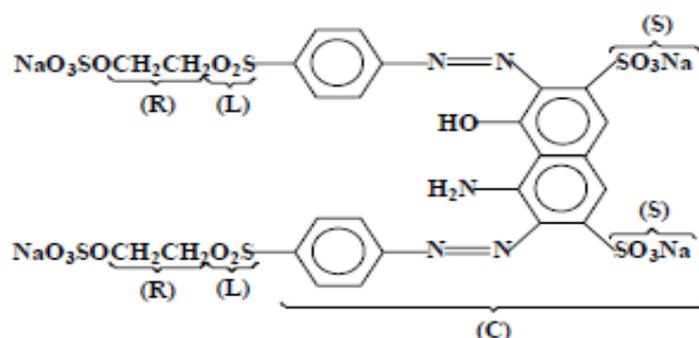


Figura 1. Estrutura do corante reativo Remazol Black 5 com a identificação das funções dos grupos que compõem a molécula do corante. C: grupo cromóforo; S: grupo de solubilização; R: grupo reativo;

Fonte: Kimura et al. (1999)

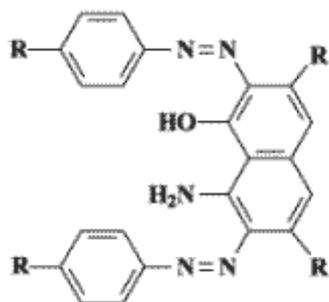


Figura 2: Exemplo de uma estrutura química característica de um grupo cromóforo de um azo corante
 Fonte: KUNZ et al. (2002)

A biotransformação dos corantes possuidores do grupo azo, frequentemente, não-tóxicos, é responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica, fazendo com que pelo menos 3.000 corantes azo comerciais não sejam mais produzidos por seus fabricantes (SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2005; GUARATINI; ZANONI, 2000).

A classe dos corantes antraquinônicos também é muito empregada na indústria têxtil por possuir alta solubilidade em água e maior estabilidade na cor do tecido tingido, por causa do estabelecimento da ligação covalente entre o corante e a fibra (MONTANO, 2007; KUNZ et al., 2002; GUARATINI; ZANONI, 2000). A grande fração de corantes desperdiçados por causa de seu alto grau de hidrólise aumenta a alcalinidade do banho de tingimento aumentando, ainda mais, o risco ambiental de seus efluentes (MONTANO, 2007).

Assim como a maioria dos corantes têxteis, os corantes reativos são intencionalmente projetados para resistirem à degradação e apresentam larga resistência à degradação química, fotolítica e a biodegradação sob típicas condições aeróbicas usadas em sistemas de tratamentos convencionais. Alguns autores têm demonstrado que esses compostos na forma não-hidrolisada apresentam alta estabilidade hidrolítica em meio neutro, permitindo um tempo de vida de 50 anos em ambientes aquáticos, causando expressiva preocupação quanto aos aspectos ecológicos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

2.2. Tratamentos

Um problema crescente para a indústria têxtil é a exigência da legislação governamental com relação à remoção da cor nos efluentes industriais. As necessidades urgentes de proteção ambiental de todo o mundo vêm promovendo a prevenção da transferência de problemas de poluição de um ambiente para outro. Isso implica que a indústria deve desenvolver tratamento de seus efluentes *in loco* antes de despejá-los. Para o atendimento de tais requisitos, tanto as indústrias como os cientistas têm direcionado suas pesquisas na busca de tratamentos e tecnologias visando à descoloração de corantes nos efluentes.

Há diversas formas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos (Figura 3). Nos processos físicos há técnicas de adsorção e nanofiltração, que consistem na separação efetiva de moléculas de corante do efluente, porém são de alto custo. A técnica de adsorção se baseia na remoção do corante pela passagem do efluente em carvão ativo, sílica gel, derivados de celulose, entre outros. A nanofiltração necessita de membranas especiais que possibilitam a boa remoção da cor. As técnicas de tratamento por processo químico baseiam-se na remoção da cor do efluente por meio de clivagem das moléculas do corante em processos catalíticos ou radiação ultravioleta (GUARATINI; ZANONI, 2000).

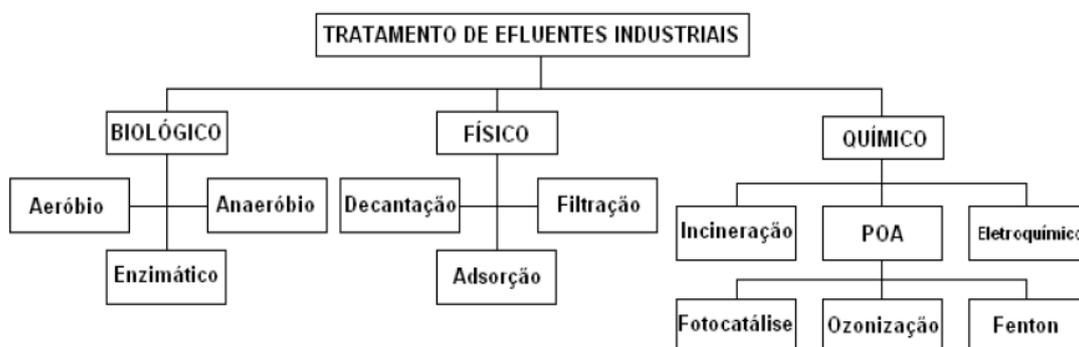


Figura 3 - Organograma das classes de tratamentos de efluentes (POA- Processos Oxidativos Avançados)

Fonte: Forgiarini (2006).

Dentre os processos biológicos, o sistema de lodo ativado é o mais utilizado, consistindo na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e oxigênio, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte de matéria orgânica (KUNZ et al., 2002). Os processos de lodo ativado ou lagoas aeradas são ineficientes para a descoloração, embora eles consigam a redução da demanda química de oxigênio. Essa ineficiência para descoloração é provavelmente em razão do baixo conteúdo de nutrientes (nitrogênio e fósforo) nessas águas e à toxicidade causada pela presença de compostos fenólicos (RODRIGUES, 2003). Nesse processo, grande parte dos corantes sintéticos é recalcitrante à biodegradação, criando um problema antiestético nas águas que o recebem em virtude da coloração remanescente.

Os métodos para remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO) da maioria dos efluentes estão bem estabelecidos. Já os corantes são mais difíceis de tratar por causa de sua origem sintética e, principalmente, pela estrutura aromática complexa.

Um dos maiores problemas em águas residuárias é a recalcitrância de certas substâncias. O processo de tratamento pode ser dividido em quatro grupos: separação (concentração de orgânicos sem alteração química), de degradação (oxidativos com a intenção de mineralizar os orgânicos para a forma de CO_2 e água), os que modificam quimicamente os constituintes do efluente, mas não levam à mineralização (processos de redução, como, por exemplo, à desalogenação), e a preparação do efluente pela adição de certos compostos químicos para tratamento subsequente por degradação ou separação, quebra de emulsões, floculação, precipitação ou ajuste de pH (RODRIGUES, 2003).

Em recentes revisões sobre tecnologias emergentes para o tratamento de resíduos industriais, encontra-se descrita a grande parte das tecnologias avançadas para tratamento de efluentes têxteis (MONTANO, 2007; NOGUEIRA et al., 2007; ROBINSON et al., 2001). Alguns processos, como o de ozonização, apresentam custo muito elevado. Outros processos, como a eletrólise, permitem uma eficiência maior que os sistemas convencionais, com

um baixo custo operacional. A fotocatalise com TiO_2 mostra-se promissora, mas pela limitada penetração da luz UV na solução de corante, autores (VANDEVIVERE et al., 1998) utilizaram um pré-tratamento com ozônio. Nesse caso, a cor foi completamente removida e o carbono orgânico total (COT) reduzido em 90%.

Segundo Banat et al. (1996) nenhum processo aplicado de forma individual parece ser capaz de descolorir, efetivamente, os resíduos aquosos das indústrias têxteis e, geralmente se preconiza a aplicação de métodos combinados. Neste mesmo trabalho citam numerosas técnicas físicas e químicas que incluem floculação físico-química combinada com flotação, eletroflotação, floculação com Fe(II)Ca(OH)_2 , filtração por membrana, coagulação eletrocinética, degradação química, troca iônica, irradiação, precipitação, ozonização, adsorção e o método de tratamento Katox (comercial), envolvendo o uso de carvão ativado e misturas de ar. Contudo, o tratamento de águas residuárias coloridas e sua descoloração parece ainda ser uma tarefa difícil.

Reações como hidrólise, fotólise, ionização, vaporização e adsorção físico-química podem ocorrer no meio ambiente, ocasionando à degradação de compostos. Por exemplo, o uso de métodos baseados em reações fotoquímicas tem se mostrado importante como etapa primária na degradação de alguns corantes, segundo Guaratini e Zanoni (2000), uma vez que os corantes sintéticos apresentam, a princípio, alta estabilidade quando submetidos à luz visível ou ultravioleta.

Rodrigues (2003) destaca a ozonização como um método de transformação química. Dessa forma, grandes quantidades de ozônio são necessárias para uma degradação extensiva dos corantes. Os produtos da oxidação são, então, removidos por floculação ou sujeitos a processos de tratamento microbiano. A oxidação por ozônio é capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos. Esse método mostra os melhores resultados na oxidação de moléculas menores, resultando na redução da coloração. Essas pequenas moléculas

podem ter propriedades tóxicas, e assim a ozonização usada em conjunto com um processo físico pode resolver o problema.

Os micro-organismos têm sido intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do ambiente, e muitas pesquisas de degradação de compostos químicos mostram como vários deles são extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Eles transformam os compostos orgânicos tóxicos em compostos mais simples como CO_2 e H_2O , com custos relativamente baixos. Esse tipo de tratamento fundamenta-se na utilização dos compostos presentes no efluente, como substrato para crescimento e manutenção do micro-organismo (FORGIARINI, 2006).

Vários são os processos biológicos que vêm sendo estudados para o tratamento dos resíduos da indústria têxtil visando à descoloração desses. Ao longo dos anos, inúmeras culturas microbianas têm sido testadas e muitas vêm sendo aplicadas na descoloração de corantes têxteis (BANAT et al., 1996). Segundo Banat et al. (1996), dentre os micro-organismos relacionados com a descoloração dos corantes têxteis estão as bactérias, fungos, algas, e os consórcios de bactérias. Entre eles se destacam os fungos basidiomicetos degradadores de lignina, eficientes na degradação de uma grande variedade de compostos e corantes (KAMIDA et al., 2005) (Tabela 3).

Gugliotta (2001) avaliou 30 linhagens de fungos basidiomicetos das quais 28 demonstraram potencial de descoloração do corante Indigo Carmine. Dessas linhagens, as três com melhores taxas de descoloração foram selecionadas e avaliadas quanto à capacidade de descolorir o efluente têxtil. *Panaeolus papilionaceus* CCB187, *Trametes villosa* CCB165 e *Hygrocybe* sp. CCB342 removeram a cor do efluente em 75,32%, 87,82% e 92,89%, respectivamente, em 31 dias pelos processos de adsorção pelo micélio e degradação, sendo que *T. villosa* e *Hygrocybe* sp. foram capazes de reduzir a toxicidade sem a formação de compostos mutagênicos.

Tabela 3: Fungos basidiomicetos capazes de degradar corantes (KAMIDA et al., 2005)

Fungos	Corante	Taxa de descoloração (%)	Tempo (dias)	Referências
<i>Phanerochaete crysoporium</i>	Orange II	99,5	1	Mielgo et al. (2001)
<i>Phellinos gilvus</i>		100	1	
<i>Pycnoporus Sanguineus</i>	CI Vat Blue	90	4	Balan e Monteiro (2001)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>		94	4	
<i>Pleurotus sajor-caju</i>		100	14	
<i>Phellinos gilvus</i>	Corante Índigo	94	4	Balan e Monteiro (2001)
<i>Pycnoporus Sanguineus</i>		100	4	
<i>Pycnoporus Sanguineus</i>		91	4	
<i>Phanerochaete crysoporium</i>	Poly R-478	95	8	Couto et al. (2000)
<i>Phanerochaete crysoporium</i>	Sp-g (diazó)	89	28	Martins et al. (2001)
		88	29	
<i>Trametes versicolor</i>	Reactive Blue	100	12	Minussi et al. (2001)
<i>Trametes villosa</i>		100	12	
<i>Phanerochaete crysoporium</i>		50	5	
<i>Phanerochaete crysoporium</i>	Remazol Blue RR	95	8	Toh et al. (2003)
	Remazol Red RR	97	8	
<i>Dichomitos Squalens</i>	Brilhant Green	100	5	Gill et al. (2002)
	Cristal violeta	100	5	
	Vermelho cresol	100	5	
	Vermelho congo	100	5	

	Orange II	100	5	
<i>Phanerochaete crisporium</i>	Brilhant Green	100	5	Gill et al. (2002)
	Cristal violeta	58,3	5	
	Vermelho cresol	20	5	
	Vermelho congo	84	5	
	Orange II	52,9	2	

A grande motivação dos pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de micro-organismos versáteis, capazes de degradar, de maneira eficiente, um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabe-se que isso é muito difícil, principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ, 1999).

Moraes (1999) observou que processos de tratamentos combinados aumentam, consideravelmente, a biodegradabilidade do efluente, ao estudar diversos tipos de tratamentos, a combinação fotocatalise e biológico foram os que demonstraram resultados mais promissores.

Torrades et al. (2004) avaliando a descoloração dos corantes CI vermelho reativo 141 e 238, utilizando reação de Fenton observou que a introdução de luz solar e artificial pelo processo de foto-Fenton resultou no aumento significativo na descoloração dos corantes. Resultados similares foram obtidos por Montano (2007), na descoloração de corantes reativos, finalizando tratamentos biológicos com processos oxidativos avançados (foto-Fenton).

Tauber et al. (2005) verificaram altas taxas de degradação de azo corantes tratando-os com lacase e ultrassom. Esses corantes não apresentaram altas taxas de descoloração quando observados isoladamente.

2.3. Biodegradação da lignina

Atualmente, estudos têm demonstrado que os fungos degradadores da madeira utilizam o mesmo mecanismo de degradação da lignina para degradar compostos recalcitrantes como os corantes têxteis (ARANTES, 2008; AGUIAR, 2008; GOODELL et al., 1997).

A lignina, principal componente responsável pelo suporte estrutural de plantas vasculares, é um biopolímero tridimensional, de alto peso molecular, estrutura complexa, irregular e altamente insolúvel e recalcitrante. Diferentemente da maioria dos polímeros naturais, o processo degradativo da lignina é altamente complexo (WOOD; GARCIA-CAMPAYO, 1994). Por ser uma estrutura de alta complexidade e recalcitrância, não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas, como acontece com a maior parte dos polímeros naturais. Seu processo de degradação é dependente de diversos fatores (HOFRICHTER, 2000; KIRK et al., 1978).

De modo geral, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduases, representadas, principalmente, por lacases, manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxidos de hidrogênio, além de compostos intermediários de baixa massa molar (MOREIRA-NETO, 2006).

Estudos sobre os compostos de baixa massa molar (CBMM) obtiveram considerável expressão nas últimas décadas, por explicarem como ocorre o início da degradação da madeira. Isso porque, apesar do considerável conhecimento adquirido a respeito do papel das enzimas na biodegradação dos constituintes da madeira, sabe-se que o processo de biodegradação por fungos não pode ser explicado unicamente com base na ação das diversas enzimas lignocelulolíticas por eles secretadas (ARANTES, 2008, GOODELL et al., 1997).

Os mecanismos pelos quais as enzimas produzidas pelos fungos de podridão parda e branca penetram e degradam a parede celular da madeira ainda não são totalmente compreendidos. Sabe-se que as enzimas

lignocelulolíticas não são capazes de penetrar na estrutura da parede celular nas fases iniciais da degradação em razão de seu alto peso molecular (BLANCHETTE et al., 1997). Existem teorias sugerindo que os iniciadores do processo de degradação da parede celular seriam pequenas moléculas as quais poderiam se difundir facilmente desde a hifa e penetrar nos poros da matriz lignocelulósica. Esses compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos poros já existentes (ARANTES, 2008; AGUIAR, 2008; GOODELL et al., 1997).

2.3.1. Reação de Fenton e a biodegradação da madeira

Vários autores defendem a teoria de degradação da madeira por espécies de oxigênio reativo, entre eles, Halliwell (1965) foi o pioneiro a defender a existência de um sistema celulolítico não-enzimático, ao observar a formação do radical hidroxila, gerado pela reação de Fenton, a qual ocorre pelo envolvimento do ferro com o peróxido de hidrogênio durante a degradação da madeira.

Outros trabalhos da época também sugeriram a participação da reação de Fenton durante biodegradação da madeira, após os estudos de Koenigs (1972a,b 1974a,b, 1975), os quais suportaram a teoria de Halliwell ao verificarem a presença de ferro na madeira, a produção de peróxido de hidrogênio extracelular pelos fungos de podridão parda e a capacidade de despolimerização da madeira pela reação de Fenton (KIRK et al., 1989, 1991; HIGHLEY, 1977).

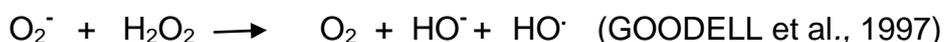
Estudos têm demonstrado que a modificação da lignina pela desmetoxilação/hidroxilação é resultante da oxidação da mesma por $\bullet\text{OH}$ através de várias reações similares às que ocorrem durante o ataque de fungos de decomposição parda à madeira (FILLEEY et al., 2000; ANDER et al.,

1988; ENOKI et al., 1988), evidenciando uma possível participação de $\bullet\text{OH}$ na modificação oxidativa da lignina por fungos de decomposição parda.

Com base em todas essas evidências e muitas outras encontradas na literatura, a reação de Fenton parece ser uma rota plausível para a produção de espécies reativas de oxigênio no processo de biodegradação da madeira. Embora múltiplas teorias tenham sido propostas para explicar a geração de Fe^{2+} a partir do Fe^{3+} presente na madeira na forma de hidr(óxidos) insolúveis, e a produção de peróxido de hidrogênio extracelular, pouco se sabe a respeito das modificações causadas aos componentes da madeira pela reação de Fenton gerada *in vivo* (ARANTES, 2008).

As vias até agora propostas para a produção do reagente de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) *in vivo* incluem a participação de CBMM com capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (peptídeos e compostos aromáticos), além da enzima celobiose desidrogenase (CDH).

Outra forma de gerar radicais hidroxilas na presença de metais é pela reação de Haber-Weiss (1934):



Essa reação é conhecida por ocorrer por meio da redução superóxido de íons férricos com peróxido de hidrogênio, resultando em íons ferrosos para a produção de radicais hidroxilas.

2.3.1.1. Sistema Fenton

O ferro é um elemento essencial para os fungos de podridão branca, pois faz parte do sítio ativo das peroxidases (HOFRICHTER, 2002; MARTÍNEZ, 2002) e é utilizado por fungos de podridão parda e branca na geração de radicais hidroxila pela reação de Fenton (AGUIAR et al., 2007; HAMMEL et al., 2002; GOODELL et al., 1997).

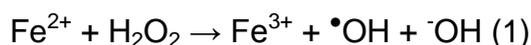
A quantidade de ferro presente na madeira é suficiente para gerar esses radicais, os quais são propostos como os principais oxidantes de baixa massa molar atuantes na degradação de materiais lignocelulósicos, principalmente os polissacarídeos, por fungos de podridão parda (HAMMEL et al., 2002; KEREM et al., 1999; GOODELL et al., 1997). Como o ferro é encontrado predominantemente na madeira em sua forma oxidada (Fe^{3+}), a produção de agentes quelantes pelos micro-organismos para solubilizá-lo e reduzi-lo é de extrema importância (GOODELL et al., 1997; SHIMADA et al., 1997).

Goodell et al. (1997) mostraram que um extrato de baixa massa molar (menor que 1 kg/mol) de um cultivo do fungo *Gloeophyllum trabeum* possuía compostos do tipo catecol com atividade redutora de Fe^{3+} . Esses compostos exibiram atividade pró-oxidante, devido à maior formação de radicais OH entre o metal e H_2O_2 . Os estudos permitiram concluir que esse fungo usa um ciclo extracelular de oxirredução de quinonas para gerar os dois reagentes de Fenton. Dois anos depois, foram identificados dois agentes redutores em cultivos desse mesmo fungo: 2,5-dimetoxi-hidroquinona e 4,5-dimetoxi-catecol e suas respectivas formas oxidadas (KEREM et al., 1999; PASZCZYNSKI et al., 1999).

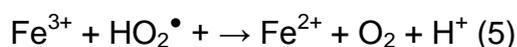
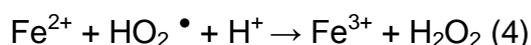
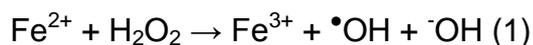
Alguns compostos com atividade redutora de íons Fe^{3+} são encontrados naturalmente na madeira (extrativos) ou produzidos durante sua biodegradação (principalmente produtos derivados da lignina) (GOODELL et al., 2006; AGUIAR et al., 2006; FERRAZ et al., 2001). Recentemente, Aguiar e Ferraz (2007) avaliaram a atividade redutora de Fe^{3+} e Cu^{2+} promovida por vários compostos fenólicos com estruturas semelhantes aos extrativos e produtos de degradação da lignina. O íon Cu^{2+} ao ser reduzido também decompõe H_2O_2 a radical hidroxila (AGUIAR et al., 2007). Esses compostos poderiam promover a reação de Fenton mesmo em cultivos de fungos causadores de podridão branca, pois se acreditava, até então, que a reação de Fenton seria um mecanismo de degradação da madeira realizado apenas por fungos de podridão parda (ARANTES; MILAGRES, 2006a).

2.3.1.2. Fundamentos da reação de Fenton

A reação de Fenton é baseada na reação entre peróxidos (normalmente H_2O_2) e ferro em meio ácido para a formação de espécies reativas de oxigênio “ROS”, principalmente o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). De uma forma geral, os mecanismos da reação de Fenton podem ser representados pelas seguintes equações (Eq. 1-5):



Fe^{3+} (adicionado ou gerado a partir de Fe^{2+} na eq. 1) resulta nas seguintes etapas (ARANTES, 2008):



A partir das equações acima verifica-se que o ferro cicla entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , e duas fases reacionais podem ser distinguidas.

- Primeira fase – Fe^{2+} inicia a decomposição de H_2O_2 , resultando na geração de $\cdot\text{OH}$ (Eq. 1), reação muito rápida ($k_1 = 63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (KANG et al., 2002)).
- Segunda fase – inicia-se após a maior parte de Fe^{2+} ser oxidada a Fe^{3+} . Nesta fase ocorre uma sequência de reações de propagação entre Fe^{3+} e H_2O_2 (Eq. 2) ou $\text{HO}_2\cdot$ (Eq. 5), as quais formam um ciclo que se mantém pela regeneração de Fe^{2+} . Velocidade da reação é lenta ($k_2 = 0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (KANG et al., 2002)).

Na reação de Fenton o pH é uma variável chave na eficiência do tratamento, sendo mais efetivo na produção de espécies reativas de oxigênio em condições ácidas (pH entre 2 – 3), e torna-se ineficiente à medida que o pH

é aumentado. Essa diminuição na eficiência da reação ocorre em virtude da baixa concentração de ferro na solução, em decorrência da formação e precipitação de hidróxidos ($\text{Fe}_x(\text{OH})_y$), os quais têm uma baixa atividade e não reagem com peróxido de hidrogênio (NOGUEIRA et al., 2007; SYLVA, 1972).

2.3.2 CBMM envolvidos na biodegradação da madeira

Dentre os compostos de baixa massa molar produzidos por fungos basidiomicetos que atuam de forma direta sobre os componentes da parede celular, encontram-se os compostos aromáticos quelantes e redutores de Fe^{3+} representados pelos quelantes de metais, oxalatos e peptídeos. Na presença de peróxido de hidrogênio, esses compostos podem desempenhar papel degradativo, atacando a celulose e a hemicelulose da madeira, com radicais gerados pela reação do tipo Fenton (Milagres et al., 2002).

2.3.2.1 Ácido oxálico

O ácido oxálico pode atuar de formas distintas na biodegradação da madeira. Este composto age de forma direta, por um ataque sobre a celulose e polioses na madeira provocando hidrólise ácida (HIGHLEY; DASHEK, 1998), ou de forma indireta, pelo abaixamento do pH no microambiente próximo à hifa fúngica, protegendo o fungo, por exemplo, contra a geração de espécies de oxigênio reativo “ROS” próximo à hifa (GOODELL et al., 1997).

Goodell e colaboradores (1997) sugerem que o ácido oxálico produzido por fungos de decomposição parda auxilia a reação de Fenton, solubilizando Fe^{3+} e transportando-o de regiões de pH mais ácido (ao redor da hifa fúngica) para regiões na madeira com o pH menos ácido, permitindo, então, a redução

de Fe^{3+} por compostos fúngicos redutores de ferro e a formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton a certa distância da hifa fúngica.

Highley e Dashek (1998) e Schimidt et al. (1981) reportaram que a degradação de celulose pelo sistema Fenton *in vitro* é inibida por elevadas concentrações de ácido oxálico. Entretanto, Goodell e colaboradores (1997) verificaram que a produção de elevadas concentrações extracelulares de ácido oxálico por fungos de decomposição parda poderia ser uma forma de prevenção destes a geração de radicais hidroxila próximo à hifa fúngica, pois com o abaixamento do pH extracelular na madeira, o Fe^{3+} é mobilizado, impossibilitando a reação de Fenton.

Contudo, embora diversas funções tenham sido atribuídas ao ácido oxálico durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca e parda, ainda não se sabe ao certo como sua concentração é regulada no ambiente próximo à hifa fúngica.

2.3.2.2 Peptídeos

O grupo de Enoki e Tanaka (1989) foram os primeiros a reportar o envolvimento de metabólitos extracelulares de natureza protéica na geração de radicais hidroxila por fungos degradadores de madeira, ao estudarem a relação entre a oxidação de monômeros de lignina e celulose (papel de filtro) e do ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico (KTBA) por frações protéicas extracelulares parcialmente purificadas de fungos de decomposição parda.

Em estudos posteriores, o mesmo grupo isolou os metabólitos protéicos extracelulares a partir de culturas de fungos de decomposição branca e parda cultivados em cavacos de madeira. Os compostos parcialmente purificados foram caracterizados como glicopeptídeos de baixa massa molar (1 – 5 kDa) capazes de quelar Fe^{3+} , reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e com elevada afinidade por Fe^{2+} (ENOKI et al.,

2003; HIRANO et al., 2000; TANAKA et al., 1999; ENOKI et al., 1997; TANAKA et al., 1996; HIRANO et al., 1995; ENOKI et al., 1992; TANAKA et al., 1991).

O grupo de Enoki sustenta a teoria de no estágio inicial de degradação da parede celular da madeira por fungos causadores de decomposição branca e parda, ocorrer a secreção de glicopeptídeos de baixa massa molar, que reduzem Fe^{3+} presentes na madeira e complexam-se com o Fe^{2+} produzido. O complexo glicopeptídeo- Fe^{2+} , então, catalisa reações de oxirredução entre O_2 e um doador de elétrons, como NADH, para produzir peróxido de hidrogênio. Posteriormente, o complexo glicopeptídeo- Fe^{2+} reduz o peróxido de hidrogênio gerando radicais hidroxila via reação de Fenton, que ataca oxidativamente os constituintes da madeira (TANAKA et al., 1996; HIRANO et al., 1995; ENOKI et al., 1992).

Entretanto, esse modelo oxidativo ainda requer mais estudos, uma vez que até o momento não há trabalhos que reportem à produção extracelular de NADH por fungos degradadores de madeira. Além disso, se esse modelo for realmente utilizado por estes fungos, é provável que algum outro composto possa atuar como doador de elétron ao invés de NADH (ARANTES, 2008).

Estudos de Gao e colaboradores também propõem a participação de peptídeos de baixa massa molar na produção de radicais hidroxila via reação de Fenton, tanto em fungos de decomposição branca quanto em fungos de decomposição parda (WANG et al., 2006; YANG et al., 2004; WANG; GAO 2003, 2002; WANG et al., 2002).

2.3.2.3 Compostos aromáticos quelantes e redutores de Fe^{3+}

Fekete, Chandhoke e Jellison (1989) foram os primeiros a identificar a produção de compostos quelantes de ferro por fungos degradadores de madeira. Em seguida, o grupo de Goodell e Jellison pelos inúmeros trabalhos, determinou, a partir de compostos isolados de culturas extracelulares de

Gloeophyllum trabeum, que esses quelantes são de baixa massa molar (XU; GOODELL, 2001; PASZCZYNSKI et al., 1999; GOODELL et al., 1997; CHANDHOKE et al., 1992; JELLISON et al., 1991) e são, principalmente, compostos aromáticos como os derivados de ácido hidroxifenilacético, de ácido hidroxibenzoico e de hidroxibenzeno (GOODELL et al., 1997).

Goodell e colaboradores (1997), utilizando uma fração de baixa massa molar (< 1 kDa) com uma mistura de 15 compostos de tipo catecolato obtidos da cultura de *G. trabeum*, mostraram que essa fração foi capaz de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e promover formação de radicais hidroxila (atividade pró-oxidante) entre ferro e peróxido de hidrogênio. Com base nesses e em outros resultados prévios do seu grupo, Goodell et al. (1997) postularam a hipótese de esses compostos aromáticos de baixa massa molar com capacidade de quelar e reduzir íons Fe^{3+} estar envolvidos em um sistema oxidativo não-enzimático durante a degradação da madeira por fungos de decomposição parda, pela mediação da reação de Fenton, para a geração de radicais hidroxila.

A hipótese sugere que a hifa do fungo de decomposição parda crescendo no lúmen secreta ácido oxálico, quelantes aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} e peróxido de hidrogênio e esses reagentes difundem para a parede celular da madeira. O oxalato abaixa o pH (~ 2,5) do ambiente de degradação e gera um gradiente de pH por intermédio da parede celular da madeira. O oxalato quela o ferro ligado à celulose para formar complexos Fe-oxalato solúveis, que difundem na parede celular para uma região de pH mais elevado (pH 4 – 4,5). Nessa região, o ferro é, então, seqüestrado desses complexos pelos quelantes aromáticos e é reduzido a Fe^{2+} . O Fe^{2+} , assim, reage com peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) para produzir radicais hidroxila, os quais são capazes de reagir tanto com lignina quanto com os polissacarídeos presentes na parede celular da madeira (GOODELL et al., 1997) (Figura 4).

Até o momento essa teoria de que fungos de decomposição parda empregam agentes quelantes aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} para mediar a reação de Fenton e criar radicais hidroxila foi proposta e baseada, principalmente, nos compostos isolados e caracterizados de culturas

extracelulares de um único fungo de podridão parda *G. trabeum* (SUZUKI et al., 2006; COHEN et al., 2004, 2002; JENSEN et al., 2002, 2001; XU; GOODELL, 2001; KEREM et al., 1999; PASZCZYNSKI et al., 1999; KEREM et al., 1998; GOODELL et al., 1997; CHANDHOKE et al., 1992; JELLISON et al., 1991), com exceção de *Serpula lacrymans* (SHIMOKAWA et al., 2004), algumas espécies de *Gloeophyllum* (NEWCOMBE et al., 2002) e *Perenniporia medulla-panis* e *Wolfiporia cocos* (ARANTES, 2008).

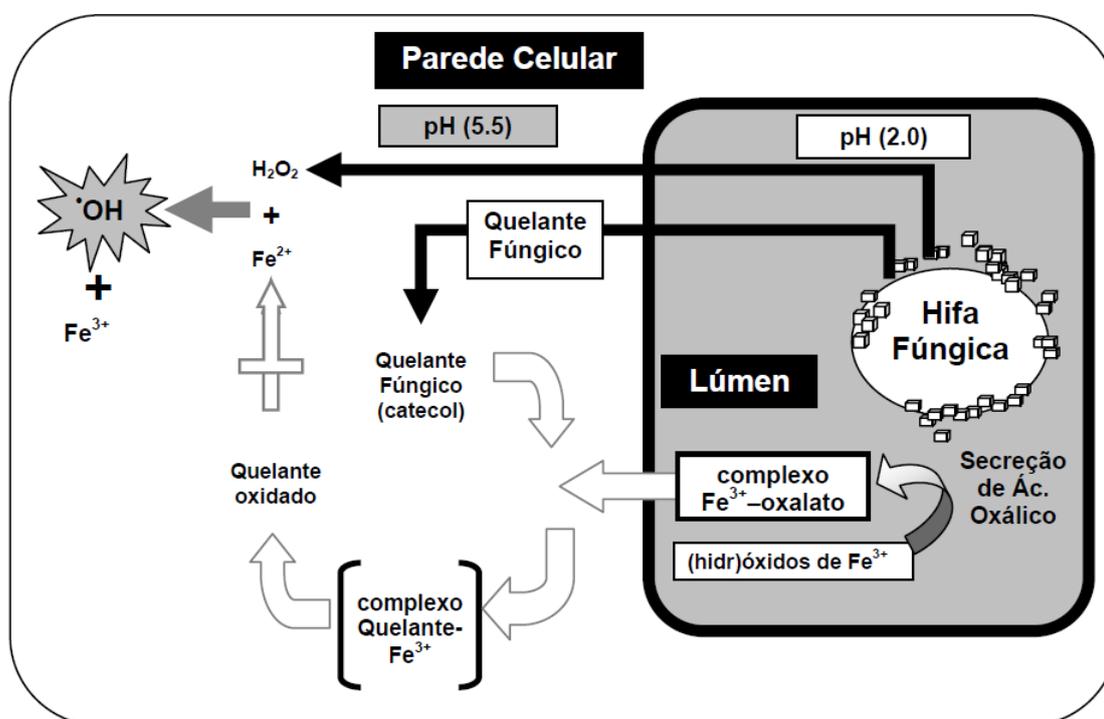


Figura 4: Mecanismo proposto para a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton mediada por compostos aromáticos com atividade redutora de Fe^{3+} produzidos por fungos de decomposição parda

Fonte: ARANTES, 2008, adaptado de Jellison et al., 2007

Contudo, mais estudos são necessários para constatar se esse sistema oxidativo de baixa massa molar, envolvendo compostos redutores de ferro na geração de radicais hidroxila pela reação de Fenton, é comum entre outros fungos de decomposição branca ou específico do gênero *Gloeophyllum*.

Em estudos recentes, Arantes (2008) forneceu evidências experimentais de que este mecanismo de degradação pode estar presentes em fungos de

podridão parda e branca, ao constatar a utilização deste sistema oxidativo pelo composto de baixa massa molar produzidos por *P. medulla-panis* e *W. cocos*.

2.3.2.3.1 Agentes quelantes de Fe³⁺

O ferro é um dos elementos mais importantes e necessários para a vida, pois faz parte das mais diversas funções biológicas, como por exemplo, transporte de oxigênio, fixação de nitrogênio e de numerosas reações de fotossíntese. Apesar de ser abundante na natureza na forma de Fe (III), é altamente insolúvel em pH fisiológico (pH ~ 7). Isso limita sua disponibilidade em manter o metabolismo celular da maior parte dos micro-organismos. Como resultado, vários micro-organismos crescendo em condições de baixa concentração de ferro produzem CBMM com elevada afinidade por Fe³⁺, denominados sideróforos. A função desses compostos é sequestrar e solubilizar Fe³⁺ para posterior assimilação (NEILANDS, 1984).

Apesar de poucos estudos de captação de ferro em fungos, dados já reportados indicam que algumas espécies utilizam diversos mecanismos (KOSMAN, 2003). Dois mecanismos distintos têm sido reportados para a captação de ferro em fungos: no primeiro ocorre a assimilação redutiva do ferro, que depende da redução extracelular de Fe³⁺ a Fe²⁺, e um outro denominado assimilação não-redutiva do ferro, no qual os complexos de quelantes de ferro quelam ao Fe³⁺; em seguida, ligam-se a receptores específicos, localizados na superfície da membrana. Ali, vários processos redutivos ocorrem e o ferro reduzido é liberado no interior da célula na forma de Fe²⁺ (BENITE et al., 2002; GOODELL et al., 1997; MACHUCA, 1995).

Os quelantes de ferro podem diferenciar muito em suas funções em relação à afinidade pelo metal (estabilidade constante em diferentes estados de valência), pH ótimo, temperatura ótima e outros parâmetros ambientais.

Fungos degradadores de madeira produzem vários compostos quelantes de Fe^{3+} , como ácidos orgânicos e compostos com estruturas do tipo catecol e hidroxamato; porém, esse grupo se distingue de outros fungos pela habilidade de produzir compostos do tipo catecol (ARANTES; MILAGRES, 2006a; GOODELL et al., 1997), os quais têm sido relacionados com o processo de biodegradação da madeira e não com os mecanismos de captação de ferro (GOODELL et al., 1997).

As estruturas dos quelantes podem apresentar, além do grupo funcional característico, um ou mais aminoácidos, ou às vezes alguns cromóforos, mas, de qualquer forma, em todos os casos, eles são complexados, principalmente por meio de átomos de oxigênio, formando seis coordenados com Fe^{3+} (KIM et al., 2009; WINKELMANN, 2007; SANTIAGO, 1999; MACHUCA, 1995).

Alguns trabalhos têm reportado que a produção de compostos quelantes de ferro por fungos degradadores de madeira é regulada pelo nível de ferro no meio extracelular (ARANTES, 2008; JELLISON et al., 1997; JELLISON et al., 1991, FEKETE et al., 1989), indicativo de que esses quelantes também poder estar envolvidos com o processo de captação de ferro, considerando que esses fungos necessitam de ferro para várias funções biológicas, assim como para produção de algumas enzimas ligninolíticas. Assim, é esperado que eles também tenham um sistema específico para a captação de ferro em um ambiente deficiente nesse metal, como a madeira.

Em estudos sobre a potencialidade de degradação de corantes têxteis e branqueamento da polpa de Kraft, os fungos basidiomicetos produtores de quelantes de ferro apresentam os melhores resultados, destacando-se *Lentinus edodes* (Minussi et al. 2001) e *Trametes versicolor* (Milagres et al. 2002). Tais trabalhos levaram Milagres e colaboradores (2002) a concluir que a degradação desses compostos não está ligada apenas à atividade ligninolítica desses fungos, mas também à presença de compostos de baixa massa molar possuidores de quelantes de ferro.

2.4. Papel dos fungos basidiomicetos na degradação de compostos recalcitrantes

A decomposição da matéria orgânica é um processo que ocorre naturalmente pela ação de micro-organismos como fungos e bactérias. Tais organismos se utilizam dessas substâncias orgânicas para a obtenção de nutrientes e energia (RABINOVICH et al., 2004). No caso particular de compostos orgânicos de elevada toxicidade e complexidade, são poucos os organismos capazes de não somente degradá-los, mas também de suportar as condições adversas que esses compostos impõem ao ambiente em que se encontram depositados (OKADA, 2010).

Os fungos basidiomicetos, pertencentes ao filo basidiomycota do reino Fungi, parecem ser os organismos com maior capacidade de degradar poluentes orgânicos persistentes. Morfologicamente, são caracterizados pela produção de esporos de origem sexuada (estruturas denominadas basídios), apresentam micélio dicariótico durante maior parte do ciclo sexual e hifas septadas que podem formar anças (alças de conexão envolvidas na manutenção da dicariose característica desse grupo) (ALEXOPOULOS et al., 1996). Na natureza, desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes. Crescem, principalmente, sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Até o ano de 2008 haviam registros de 31.515 espécies conhecidas de basidiomicetos (KIRK et al., 2008). A maioria das espécies de basidiomicetos utiliza os componentes da madeira para seu crescimento. Dentre os degradadores de madeira, destacam-se dois grandes grupos ecofisiológicos: 1) fungos causadores de podridão branca; e 2) fungos causadores de podridão parda.

Os basidiomicetos causadores de podridão branca possuem um sistema enzimático que os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo assim responsáveis pela degradação da celulose, hemicelulose e da lignina, quebrando-a em moléculas menores até CO₂ e água. Por isso, são denominados fungos ligninocelulíticos. Os causadores de podridão parda, por

sua vez, removem, seletivamente, a celulose e a hemicelulose da madeira, com capacidade causar limitadas mudanças na lignina (GUGLIOTTA, 2001; MATHEUS; OKINO, 1998).

Os fungos de podridão branca parecem ser os únicos organismos capazes de converter lignina a CO₂. A degradação causada por esses fungos ocorre, necessariamente, de forma extracelular, uma vez que os compostos da madeira devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores susceptíveis ao transporte através da parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos. Esses fungos agem pela penetração de suas hifas pelo lúmen das células, as quais, ali instaladas, produzem uma variedade de metabólitos extracelulares que vão, assim, atuar degradando os componentes da parede celular (GOODELL et al., 1997)

Inicialmente, pensava-se que a capacidade dos basidiomicetos em degradar compostos xenobióticos devia-se à semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e as moléculas de alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os compostos aromáticos. Atualmente, sabe-se que a capacidade biodegradativa de fungos de podridão branca deve-se à presença do sistema enzimático ligninolítico inespecífico, extracelular e de alto poder oxidante (EERD et al., 2003; EVANS; HEDGER, 2001; POINTING, 2001; TUOMELA et al., 2000; MATHEUS, OKINO, 1998), além de compostos de baixa massa molar (ARANTES et al., 2008; MOREIRA-NETO et al., 2009). Esse sistema pode atuar na degradação de compostos xenobióticos, sendo capaz de mineralizar uma variedade de poluentes resistentes à degradação e eficiente na descoloração de corantes, apresentando grande potencial de utilização em tratamento de efluentes têxteis (KUNZ et al., 2002; GUGLIOTTA, 2001).

Alguns espécimes de fungos basidiomicetos nativos do Brasil tiveram sua capacidade de degradar diversas moléculas de corantes comprovada. Fungos como *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, *Trametes villosa* e *Peniophora cinerea* foram capazes de degradar o corante antraquinônico Azul Brilhante de Remazol (RBBR) (MACHADO et al., 2005b). *Trametes villosa* também foi capaz de degradar corantes reativos têxteis (MACHADO et al., 2006) e corante

Índigo carmine (GUGLIOTTA, 2001). Balan; Monteiro (2001) observaram a degradação do corante Índigo por *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pycnoporus sanguineus*.

Eerd et al. (2003) e Aust (1990) listaram uma série de vantagens em usar fungos basidiomicetos, os quais em muito contribuem em processos degradativos de compostos recalcitrantes:

Capazes de transformar um grande número de compostos com estruturas dissimilares;

capazes de diminuir o efeito tóxico de muitos xenobióticos;

libera metabólitos que podem ser degradados por outros micro-organismos;

o sistema sendo inespecífico pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para a mistura deles;

o sistema sendo produzido em resposta a condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença de lignina ou do composto poluente;

a degradação da lignina ocorre até que sua concentração seja reduzida a níveis não-detectáveis, nos quais o produto final é CO₂. Esse é o tipo de processo desejável para os xenobióticos.

No início, considerava-se que apenas basidiomicetos de podridão branca apresentavam potencial de degradar compostos recalcitrantes. Estudos mais recentes com fungos de decomposição parda, crescidos em meio líquido definido, demonstram que esses fungos usam radicais hidroxila para começar a degradação de vários polímeros sintéticos e organopolutantes, apresentando o mesmo potencial de utilização (KRAMER et al., 2004; COHEN et al., 2002; NEWCOMBE et al., 2002; SCHLOSSER et al., 2000; KEREM et al., 1998; WETZSTEIN

2.5 Biodegradação de corantes têxteis por fungos basidiomicetos tropicais

O estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por fungos basidiomicetos, com potencialidade de descolorir corantes têxteis faz parte de um projeto interinstitucional intitulado “Biodegradação de Corantes Têxteis por Fungos Basidiomicetos Tropicais”, desenvolvido pelo Instituto de Botânica, Universidade Federal do ABC – UFABC e a Universidade Católica de Santos – UniSantos, cujo objetivo geral é compreender o mecanismo envolvido na degradação de corantes têxteis por fungos basidiomicetos como subsídio para aplicação desses fungos e de seu sistema ligninolítico na redução da cor e da toxicidade de efluentes originados do banho de tingimento de fibras têxteis.

A primeira etapa desse projeto foi a seleção de linhagens, baseada na capacidade de esses fungos degradarem o corante reativo antraquinônico Azul Brilhante de Remazol R ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) em meio líquido definido em pH entre 5 e 9, e produção de quelantes de ferro de forma qualitativa.

A preocupação com o pH alcalino existe porque a maioria dos estudos envolvendo a capacidade de descoloração de corantes têxteis por fungos basidiomicetos é realizada em meios com pH ideal para o crescimento dos mesmos, em torno de 4,5. Sendo o pH dos efluentes têxteis em torno de 10, é de enorme interesse estudar o desempenho dos fungos em valores de pH alcalinos, a fim de identificar quais estarão mais aptos para posteriores utilizações na descoloração e, portanto, na descontaminação dos efluentes têxteis (CESCATO, 2006).

Dessa forma, na primeira etapa foram avaliadas 25 linhagens; *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 e *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 foram as que obtiveram melhores resultados quanto à produção qualitativa de quelantes de metais (BONFIM; VITALI, dados não publicados), descoloração do corante RBBR em pH alcalino (MOREIRA-NETO et al., submetido) e recuperação da produção de quelantes após choque de pH alcalino no meio de cultivo (PARANHOS; VITALI, dados não-publicados).

Resultados obtidos em estudos anteriores (PARANHOS; VITALI, dados não publicados) demonstraram degradação de 32% do corante reativo Vermelho FN-2BL pela fração de baixa massa molar de *Trogia buccinalis*, quando cultivado em meio, inicialmente, em pH alcalino. Quando a fração de baixa massa molar foi originária de cultivo em meio basal, apresentou baixo potencial de degradação (5%). *Peniophora cinerea* foi o fungo que apresentou a fração de baixa massa molar com maior potencial degradativo para o corante têxtil Azul Brilhante H-GR, 55 % e 23 % em cultivo com o pH inicialmente alcalino (PARANHOS, 2007).

2.6 Justificativas

No Brasil os efluentes líquidos industriais devem atender aos padrões de emissão e, simultaneamente, não desenquadrar os corpos hídricos receptores. Os parâmetros e limites a serem obedecidos para padrão de emissão são regulamentados pela Lei n. 997, de 31.05.76, aprovado pelo Decreto n. 8.468, de 08.09.76 e pela Resolução Federal n. 357, de 17.03.05, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama). Os padrões quantitativos usuais de referência para a indústria têxtil são em função das variáveis: vazão, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos em suspensão (SS), pH e temperatura, em alguns casos, adiciona-se a cor e o cromo.

Empresas têxteis de grande porte possuem lagoas com lodo ativado para tratamento. Esses efluentes, mesmo tratados, retornam às bacias hidrográficas com resíduos de compostos orgânicos (compostos azóicos) e metais capazes de provocar sérios danos à flora e à fauna fluviais e do solo. Além disso, constituem risco à saúde humana (especialmente quando o efluente é disposto em bacias usadas para abastecimento público), saúde animal e às culturas agrícolas irrigadas.

Atualmente, os processos de tratamento são concebidos, considerando os efluentes finais, constituídos pela soma de outros tantos efluentes oriundos

das operações unitárias dentro da planta têxtil, como desengomagem, tinturaria, acabamento, entre outros. O corante, utilizado no processo de tingimento, é o composto que pode provocar toxicidade, mutagenicidade e a presença de cor no efluente final, dependendo do estágio de sua degradação. Uma proposta para melhorar a eficiência no tratamento de efluentes têxteis é o desenvolvimento de tecnologia que vise ao tratamento do banho de tingimento no momento seguinte ao de sua geração, em tanque anexo. Assim, quando reunido ao tratamento final de todos os efluentes têxteis em lagoas de decantação e tratamento biológico, o efluente liberado no ambiente deverá encontrar-se muito mais isento de cor e de contaminantes. Outro aspecto a considerar-se é a redução de custos do tratamento. As águas do banho de tingimento pré-tratadas poderiam ser reutilizadas na planta ou, ainda reunidas em um único efluente, resultando em um menor custo para o tratamento final.

Nos dias de hoje, não há legislação específica obrigando o empresário gerador de efluentes têxteis a tratá-los ao ponto da retirada da coloração do efluente ou diminuição de sua intensidade, possivelmente pelo fato de não haver processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis para tanto.

Nesse sentido, o projeto interinstitucional no qual este trabalho se insere tem como objetivo a compreensão de todo o processo degradativo dos corantes reativos têxteis por fungos basidiomicetos, para servir de subsídio no desenvolvimento de tecnologia de tratamento do efluente, mais efetiva quanto à redução da cor do efluente e seus demais danos.

3. OBJETIVOS

Geral: Estudar a composição da fração de baixa massa molar de *Peniophora cinerea* e *Trogia buccinalis*, seu comportamento em pH alcalino e sua capacidade em degradar corantes têxteis.

Específicos:

- 3.1. Avaliar a capacidade de redução do Fe^{3+} nos compostos de baixa massa molar dos fungos selecionados em relação à idade fisiológica;
- 3.2. Avaliar a atividade do quelante de ferro em relação a pHs alcalinos;
- 3.3. Caracterização química das frações de baixa massa molar;
- 3.4. Avaliar a capacidade degradativa dos quelantes de ferro nos corantes reativos Azul brilhante HG-R e Vermelho FN-2BL

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Foram utilizadas as linhagens de fungos basidiomicetos de podridão branca *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 (Figura 5) e *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 (Figura 6), depositados na coleção de culturas de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica da secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Brasil).

Peniophora cinerea (Pers.) Cooke é um fungo de decomposição branca pertencente a filo Basidiomycota, família Peniophoraceae (Kirk et al., 2008) o qual tem sido descrito como fungo degradador seletivo de lignina (OKINO et al., 2000).

A linhagem empregada nesse projeto foi isolada da floresta tropical brasileira, no município de São Vicente, na região da Baixada Santista, estado de São Paulo, Brasil (OKINO et al., 2000), e selecionada para esse estudo por apresentar atividade de peroxidases, descoloração do RBBR, redução da concentração de Pentaclorofenol (MACHADO, 1998), produção de quelantes de ferro e degradação de corantes têxteis (PARANHOS; VITALI, 2007).

Trogia buccinalis (Mont.) Pat. é um fungo de decomposição branca pertencente à filo Basidiomycota, família Marasmiaceae (Kirk et al., 2008), descrito como fungo degradador seletivo de lignina (OKINO et al., 2000). A linhagem desse projeto foi isolada na região de Ribeirão Grande, estado de São Paulo, Brasil, e selecionada por apresentar atividade de peroxidases, capacidade de descolorir RBBR (MACHADO, 1998), produção de quelantes de ferro e degradação de corantes têxteis (PARANHOS; VITALI, 2007).

As culturas foram mantidas, a 4 °C, em EMA (extrato de malte ágar), constituído de: extrato de malte 2%; peptona 01 %; ágar 1,5 %; Glicose 2%.

Figura 5: *Peniophora cinerea* (Pers.) CookeFonte: www.pilzfotopage.de em 18/10/2007Figura 6: *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat.Fonte: www.cortland.edu em 18/10/2007

4.2 Corantes sintéticos

Usou-se os corantes têxteis reativos Cibacron Azul Brilhante H-GR e Vermelho FN-2BL, fornecidos por Ciba-Geyse (Figura 7). Os mesmos foram preparados na concentração de 2g/100mL com pH 10 e hidrolizados a 60 °C durante 1 hora. Os picos máximos de absorção dos corantes obteve-se por varredura em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS) no intervalo de comprimento de onda de 400-800 nm (Figura 8).



Figura 7: Corante reativo Cibacron Vermelho FN-2BL 0,02% (A) e Corante reativo Cibacron Azul Brilhante H-GR 0,02% (B)

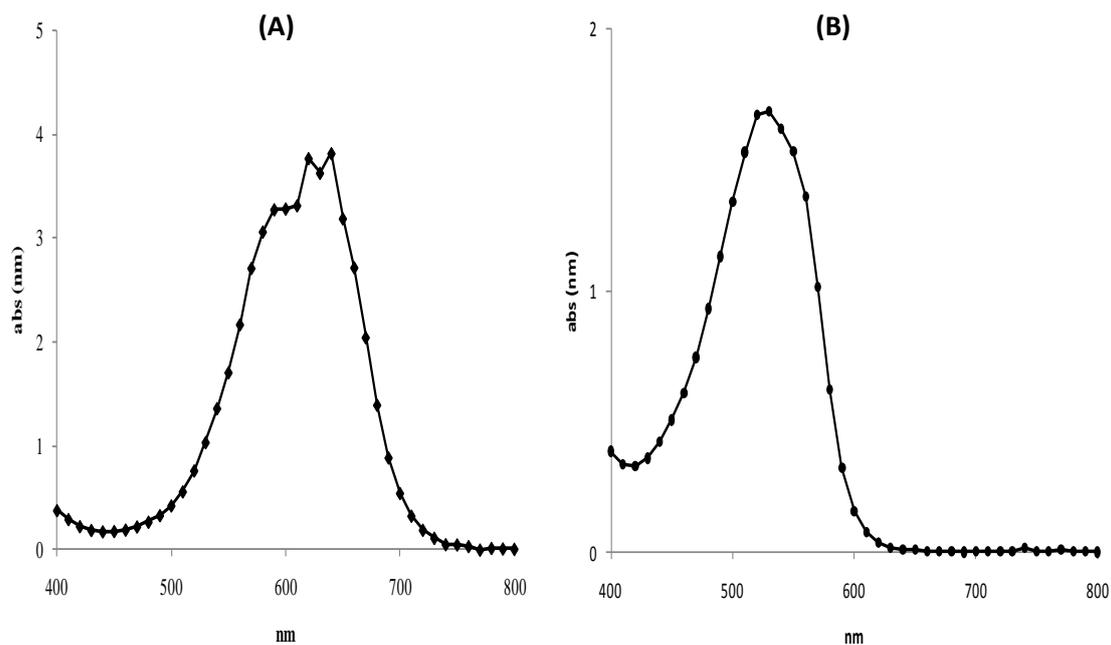


Figura 8: Scan dos corantes Azul brilhante H-GR (A) e Vermelho FN-2BL (B), nos comprimentos de onda de 400 a 800 nm

4.3 Condição de cultivo

Na fase inicial de seleção do meio de cultura mais apropriado para a execução desse trabalho, o fungo *Peniophora cinera* foi inoculado com três discos de 5 mm de diâmetro, com crescimento micelial de sete dias de incubação, em frascos de erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio basal. O experimento dividido em dois lotes, um com meio basal e outro com meio basal modificado, e metade desses lotes tiveram os pHs modificados para alcalino (8,5), no momento da inoculação, e a outra metade manteve seu pH ótimo (5,5). A duração do cultivo foi de 15 dias, a 25°C.

Na segunda etapa deste trabalho, os fungos foram inoculados com seis discos de 5 mm de diâmetro, com crescimento micelial de sete dias de incubação, em frascos de erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio basal modificado (MACHADO et al, 2006) e incubados a 25 °C no período de 21 dias. Durante esse período, em intervalos de 7,14 e 21 dias, lotes de frascos inoculados foram retirados para a obtenção e caracterização dos compostos de baixa massa molar.

4.3.1 Meio basal (KIRK et al., 1978)

Composição: 5g Glicose, 1mL Tiamina HCl, 0,45g Tartarato de Amônio, 0,2g KH_2PO_4 , 0,05g MgPO_4 , 0,016g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0499g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1 mL solução mineral (3g MgSO_4 , 1g NaCl, 100 mg $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 82 mg CaCl_2 , 100 mg CaSO_4 , 100 mg ZnSO_4 , 10 mg CuSO_4 , 210 mg $\text{AlK}(\text{SO}_4)$, 10mg H_3BO_3 e 10 mg NaMoO_4).

4.3.2 Meio basal modificado (KIRK et al., 1978, modificado por Machado et al., 2006)

Composição: 5g Glicose, 0,45g Tartarato de Amônio, 0,2g KH_2PO_4 , 0,05g MgPO_4 , 0,016g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,0499g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

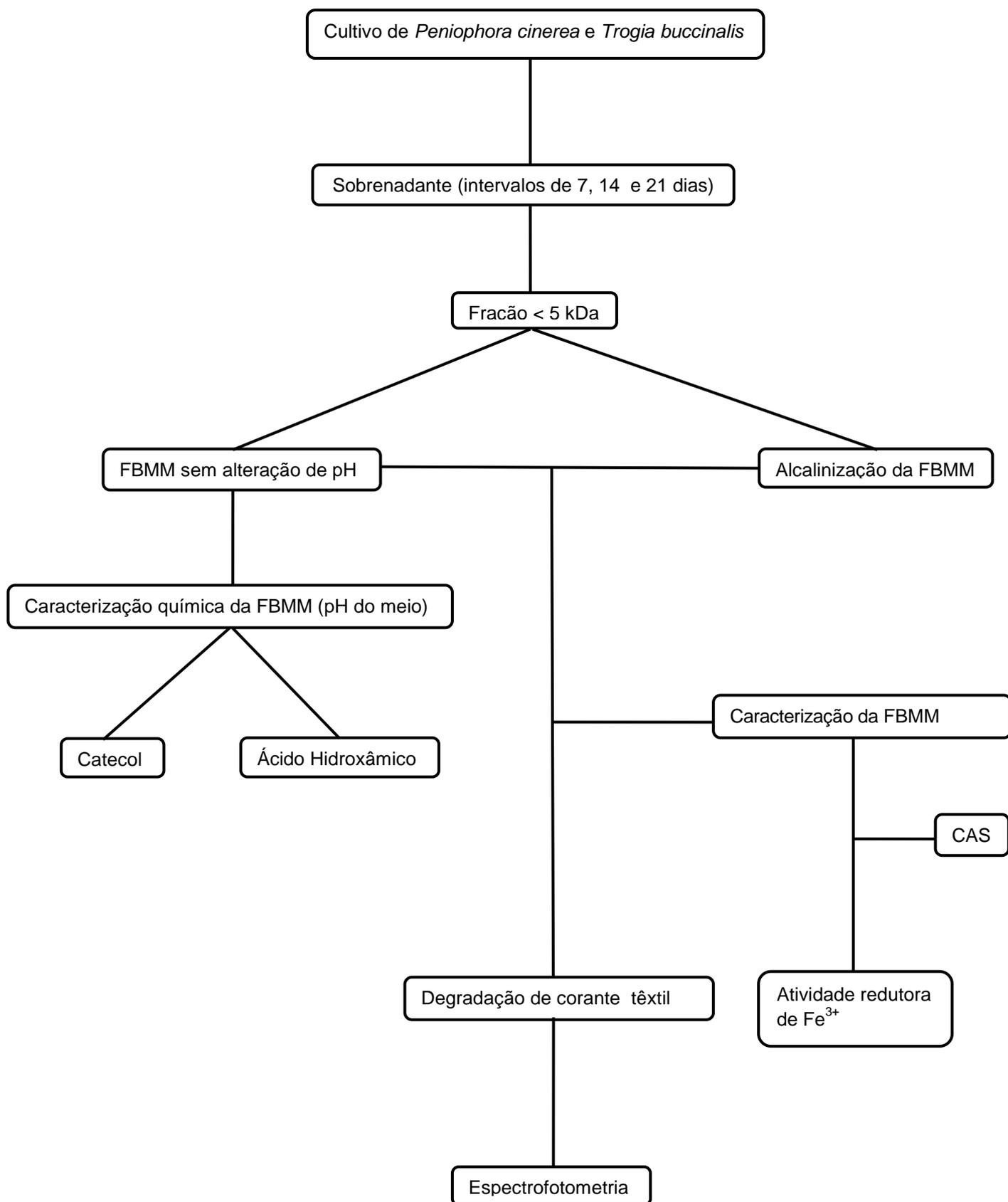
4.4 Obtenção dos compostos de baixa massa molar (CBMM) (< 5 kDa)

Após filtragem dos cultivos, triplicatas foram congeladas e liofilizadas por cinco dias. Após a liofilização, cada meio foi ressuspensão a 10% de seu volume inicial com água ultrapura. Depois, os materiais concentrados foram ultrafiltrados, utilizando-se membranas de corte 5 kDa (marca VIVASPIN 15) a 3.950 rpm por 99 min (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R).

4.5 Modificação do pH dos CBMM nas diferentes idades fisiológicas

Lotes das frações de baixa massa molar foram alcalinizadas com NaOH 2N para o pH 9. Empregando-se, como controle, frações com o pH natural.

4.6 Fluxograma das etapas do projeto



4.7 Caracterização dos compostos de baixa massa molar

4.7.1 Preparo da vidraria

Todas as vidrarias usadas para análises foram mantidas de molho em solução de HCL 6M por uma noite, e em seguida, enxaguada, exaustivamente, com água deionizada para a retirada de traços de ferro.

4.7.1.1 Método CAS para detecção de atividade de quelante de Fe³⁺

Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe³⁺, empregou-se o Método universal CAS (Cromo Azurol S) (SCHWYN; NEILAND, 1987), o qual se baseia na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador CAS e do quelante produzido pelos fungos. Esse método consistiu no preparo de um corante complexo indicador com: 6 mL de uma solução de brometo de hexa-deciltrimetilamônio (HDTMA) 10 mM, 1,5 mL de solução de cloreto férrico (1 mM FeCl₃·6H₂O em 10 mM HCl) e 7,5 mL de solução CAS (Cromo Azurol S) 2 mM. A essa solução se adicionou 4,307 g de piperazina anidra dissolvida em água deionizada e o pH ajustado para 5,6 pela adição de HCl concentrado, e, finalmente, avolumado para 100 mL. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada. O reagente CAS complexado com Fe³⁺ na solução possui uma intensa cor azul com uma absorvidade de $\xi=100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 630 nm e pH 5,6.

O ensaio consistiu na mistura de 0,5 mL da amostra e 0,5 mL da solução de reagente CAS. O branco foi constituído de 0,5 mL da solução de reagente CAS e 0,5 mL de meio de cultura não-inoculado, e, para zerar o aparelho, utilizou-se água deionizada. As leituras da absorbância (630 nm) foram determinadas após uma hora de reação e os resultados expressos como porcentagem de compostos quelantes, presentes na amostra capazes de complexar Fe³⁺ em relação ao branco. A porcentagem de quelantes produzidas foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ de unidade de CAS} = [(A_b - A_a) : A_b] \times 100$$

onde: A_b = Absorbância do branco; A_a = Absorbância da amostra

4.7.1.2 Atividade redutora de Fe³⁺

Os ensaios foram realizados em cubetas de quartzo de 2mL, com 0,375 mL de amostra, 0,4 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pHs 4,5), e 50 µL de FeCl₃ 0,5 mM (recém-preparada) (ARANTES, 2007). Após 30 minutos, no escuro, adicionou-se 100 µL de NaF 2,5 mM para paralisar a reação (AGUIAR, 2008) e 125 µL de ferrozina 2 mM adicionado à mistura e a absorbância a 562 nm foi lida imediatamente. Os resultados expressos pela quantidade de Fe²⁺ formado ($\epsilon_{562} = 27.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (STOOKEY, 1970). Para o branco, substituiu-se a amostra por água deionizada. Um controle, contendo FeCl₃ e ferrozina foi realizado para descontar a quantidade de íons Fe²⁺ formados durante o equilíbrio natural Fe²⁺/Fe³⁺ em água.

4.7.3 Caracterização química dos compostos de baixa massa molar

4.7.3.1 Derivados de catecol

Para a detecção de compostos com estruturas do tipo catecol utilizou-se o Método de Arnow (1937). Quando há estruturas de tipo catecol elas reagem com ácido nítrico produzindo uma coloração amarela, a qual muda para vermelho-laranja quando o meio reacional torna-se, fortemente, alcalino.

Essa metodologia consistiu no preparo das seguintes soluções: HCl 0,5 M, 10 g de nitrato de sódio e 10 g de molibdato de sódio dissolvidos em 100 mL de água desionizada, e NaOH 1 M. Para 0,5 mL de amostra, adicionaram-se os reagentes na seguinte ordem: 0,5 mL de HCl, 0,5 mL da solução de nitrato-molibdato e 0,5 mL de NaOH.

Após três minutos de reação, a absorbância das soluções foi lida a 510 nm e a concentração de compostos com estrutura catecol nas amostras foi determinada por uma curva de calibração preparada com ácido 2,3-dihidroxi-benzóico.

4.7.3.2 Derivados de ácido hidroxâmico

Para a detecção de compostos com estrutura de hidroxamato empregou-se o Ensaio de Csáky (1948). A reação se baseia na oxidação da hidroxilamina a nitrito em meio ácido, que é, então, estimado pela reação de cor com ácido sulfanílico e α -naftilamina.

As amostras foram, inicialmente, tratadas com carvão ativado (1% p/v), mantidas em agitador automático a 1.000 rpm (*overnight*). Após esse período, 0,2 mL da amostra tratada, foi, primeiro, hidrolisada com 0,3 mL de solução H_2SO_4 3 M, em um tubo de ensaio de vidro com um tampa de rosca de polipropileno a 100°C por seis horas. Após resfriada a temperatura ambiente, foi adicionada à amostra 0,6 mL de acetato de sódio 35% (p/v) e 0,1 mL de solução de ácido sulfanílico (1 g de ácido sulfanílico dissolvido em 100 mL de uma solução aquecida de ácido acético 30% v/v), e 0,1 mL de solução de iodo (1,3 g de iodo em 100 mL de ácido acético glacial). Após três minutos, o excesso de iodo, no meio reacional, foi removido pela adição de 0,2 mL de solução de arsenito de sódio 2 % (p/v). A seguir, adicionou-se 0,2 mL de solução de α -naftilamina (3 g de α -naftilamina dissolvida em 1 L de ácido acético, 30%, p/v).

A absorvância das soluções lida a 526 nm e a concentração de compostos com estrutura de hidroxamato, nas amostras, foi determinada por uma curva de calibração, preparada com cloreto de hidroxilamina (Sigma).

4.8 Determinação da degradação *in vitro* dos corantes reativos têxteis pelos CBMM com quelantes de metal

Cada corante reativo foi incubado junto aos compostos de baixa massa molar produzidos por *P. cinerea* e *T. buccinalis* 1:1 (v/v) (triplicata) por 72 horas a 25 °C. Como controle usou-se mistura de corante com meio de cultura sem inóculo 1:1 (v/v). A descoloração do corante foi monitorada em intervalos

de 24 horas por espectrofotometria (Genesys 10S UV-VIS) no comprimento de luz de 200 a 800 nm.

A capacidade de descoloração dos corantes foram avaliadas pela redução da absorbância do comprimento de onda característico de cada corante (530 nm corante vermelho e 640 nm corante azul), enquanto a degradação do corante foi constatada segundo o método proposto por Glenn & Gold (1983), pela razão entre as leituras da absorbância em dois comprimentos de onda em espectrofotômetro.

A porcentagem de descoloração dos corantes foi calculada com base na equação:

$$\% \text{ descoloração} = [100 - (A_c * 100)/A_b]$$

Onde: A_c = Absorbância no pico característico do corante

A_b = Absorbância do pico característico do corante no tempo 0 (zero)

4.9 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados pelo programa estatístico Minitab 15 (2011). Os resultados obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando observou-se efeito significativo superior ou igual a 95% de probabilidade ($P \leq 0,05$), as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados percentuais foram transformados na expressão abaixo, de acordo com Vieira e Hoffmann (1989).

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \sqrt{\text{valor em \%} / 100}$$

CAPÍTULO I

Avaliação das interferências da composição do meio basal na produção de quelantes de ferro e na descoloração de corantes têxteis por *Peniophora cinerea*

Ana Paula Soares Paranhos^{1,2*}, Vera Maria Valle Vitali¹, Adriana de Melo Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

² Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 5067-6067. E-mail:paulinhatin@hotmail.com

RESUMO

As condições nutricionais do meio afetam, diretamente, na fisiologia e no metabolismo dos fungos, interferindo em sua atividade enzimática, produção de quelantes e capacidade de quelação de metais. Com base nesses aspectos o presente estudo teve como objetivo avaliar a interferência da retirada da solução de vitaminas do meio basal na produção de quelantes de ferro e na descoloração de corantes têxteis por *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541. A linhagem CCIBT 2541 desse fungo foi incubada nos meios basal e basal simplificado, no escuro, a 25°C, durante 15 dias. Cada um teve os cultivos divididos em dois lotes, sendo que metade dos frascos destes lotes tiveram os pHs modificados para alcalino (8,5) no momento da inoculação e a outra metade manteve seu pH ótimo (5,5). Após o período de cultivo realizou-se o método CAS no extrato bruto e o restante dos extratos foram concentrados e ultrafiltrados (membranas de corte 5 kDa) para obtenção dos compostos de baixa massa molar. Esses compostos foram caracterizados quanto à produção de quelantes de ferro e ao potencial de descoloração de corantes reativos. A produção de quelantes de ferro no extrato bruto de *Peniophora cinerea* teve comportamento e produção similar nos dois meios de cultura testados. Quanto aos compostos de baixa massa molar, o meio basal simplificado apresentou maior produção de quelantes (51%) do que o meio basal (36%), com o pH dos meios, inicialmente, alcalinizados. Os corantes reativos Azul brilhante H-GR e Vermelho FN-2BL foram incubados com os compostos de baixa massa molar 1:1(v/v), durante 72 horas. Ambos tiveram pico de descoloração com 24 horas de incubação. Os compostos de baixa massa molar foram capazes de descolorir o corante azul em todas as condições de cultivo, sendo a taxa de descoloração praticamente a mesma em pH inicialmente alcalino (24,15% meio basal e 21% meio basal simplificado); enquanto o corante vermelho, apenas em pH ótimo (6,41% meio basal e 14,80% meio basal simplificado). Com base nestes resultados, a simplificação do meio basal não interferiu nos resultados podendo ser utilizado nos estudos dos compostos de baixa massa molar visando processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Corantes reativos; Quelantes de ferro; *Peniophora cinerea*; Reação de Fenton; Descoloração.

ABSTRACT

Evaluation of basal medium's composition interference in the production of iron chelators and decolorization of textile dyes by *Peniophora cinerea*

The nutritional conditions of the environment directly affect physiology and metabolism of fungi, interfering with their enzymatic activity, metal chelators production and chelation capacity. Based on these aspects, the present study aimed to evaluate the role of basal medium composition on the production of iron chelators and the decolorization of textile dyes by *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541. The CCIBT 2541 lineage of this species was incubated in basal medium and simplified basal medium in the absence of illumination at 25 °C for 15 days. Each one of the cultures were divided into two lots, with each half of the lots having, at the time of inoculation, its pH modified to reach alkaline conditions (pH 8,5). The other half were kept at their optimum pH (5,5). After the cultivation period the CAS method was assayed in the crude extract while the remaining extracts were concentrated and ultrafiltrated (5 kDa cutoff membranes) to obtain low molecular weight compounds. These compounds were characterized by the production of iron chelators and the potential for decolorization of reactive dyes. The production of iron chelators in the crude extract of *Peniophora cinerea* presented similar behavior and production in both media tested. As for the low molecular weight compounds, the simplified basal medium presented higher chelator production (51 %) than basal medium (36 %) with media initially alkalinized. The reactive dyes Brilliant Blue H-GR and Red FN-2BL were incubated with low molecular weight compounds 1:1 (v/v) for 72 hours. Both had decolorization peak within 24 hours of incubation. The low molecular weight compounds were able to decolorize blue dye in all culture conditions. As for these cultures in alkaline conditions, the results obtained were similar (24,15 % basal medium and 21 % simplified basal medium); As for the red dye, decolorization was only possible in optimum pH conditions (6,41 % basal medium and 14,80 % simplified basal medium). Based on these results, simplification of the basal medium did not interfere in the result therefore we suggest the use of basal medium in studies of low molecular weight compounds in biotechnology processes.

Keywords: Reactive dyes; Iron chelators; *Peniophora cinerea*; Fenton reaction; decolorization

INTRODUÇÃO

A maioria dos processos biotecnológicos a empregar fungos basidiomicetos, baseia-se em seus produtos metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. A importância do aparato enzimático desses fungos está, diretamente, relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos em processos de biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes das indústrias papeleiras e têxteis (MATHEUS; OKINO, 1998).

Estudos de potencialidade de fungos que vise aplicabilidade industrial possuem um ponto básico para a sua viabilidade, o custo, sendo o meio de cultura é a base de todo processo que vise aplicação de micro-organismos. Dessa forma, os estudos básicos sobre o metabolismo degradativo por fungos iniciam-se com meios basais, para conhecer o mecanismo utilizado por eles e posteriormente a substituição de nutrientes por substratos complexos de baixo custo.

Muitas das espécies de fungos basidiomicetos utilizam os componentes da madeira para seu crescimento. Os basidiomicetos de podridão branca necessitam de substrato com carboidratos, proteínas, glicose e lignina para seu desenvolvimento, e a capacidade desses micro-organismos em assimilar matéria orgânica dependem de sua habilidade de produção de enzimas necessárias para a degradação do substrato (TUOMELA et al., 1999).

Pesquisas recentes apontam o potencial dos fungos basidiomicetos degradadores da lignina em degradar compostos recalcitrantes. Para a degradação da lignina é necessário um sistema ligninolítico de ação extracelular, oxidativo e não-específico como o dos fungos basidiomicetos de podridão branca. Esse processo multienzimático é resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduases, além de compostos intermediários de baixa massa molar (TORTELLA et al., 2005; BALDRIAN, 2006; HUSAIN, 2006). Esse sistema pode atuar na degradação de compostos xenobióticos, sendo capaz de mineralizar uma variedade de

poluentes resistentes à degradação e eficiente na descoloração de corantes, indicando grande potencial de utilização em processos de biorremediação (MOREIRA-NETO, 2006; KUNZ et al., 2002; GUGLIOTTA, 2001). Acredita-se que os fungos basidiomicetos usam o mesmo mecanismo de degradação da madeira para a biodegradação de composto recalcitrantes, utilizando estes compostos como substrato.

Alguns espécimes de fungos basidiomicetos, nativos do Brasil, tiveram sua capacidade de degradar diversas moléculas de corantes comprovada. Fungos como *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, *Trametes villosa* e *Peniophora cinerea* degradaram o corante antraquinônico Azul Brilhante Remazol R (RBBR) (MACHADO et al., 2005b). *Trametes villosa* também foi capaz de degradar corantes reativos têxteis (MACHADO; MATHEUS, 2006) e corante Índigo carmine (GUGLIOTTA, 2001). Balan e Monteiro (2001), observaram a degradação do corante índigo por *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pycnoporus sanguineus*.

Acredita-se que os compostos de baixa massa molar (CBMM) podem estar envolvidos com o início da degradação da madeira, penetrando na parede celular e funcionando em conjunto com os metais no princípio da reação de despolimerização da parede celular da madeira. Dentre estes compostos, encontram-se os agentes quelantes de metais, oxalatos e peptídeos, com capacidade de complexar com Fe^{3+} e reduzi-lo a Fe^{2+} . Na presença de peróxido de hidrogênio, esses compostos desempenham papel degradativo, atacando a celulose e hemicelulose da madeira, por meio de radicais gerados pela reação do tipo Fenton (MILAGRES et al., 2002).

A preocupação com o pH alcalino existe pois grande parte dos estudos envolvendo a capacidade de descoloração de corantes têxteis por fungos basidiomicetos é realizada em meios com pH ideal para o crescimento dos mesmos, em torno de 4,5. Sendo o pH dos efluentes têxteis em torno de 10, é de interesse estudar o desempenho dos fungos em valores de pH alcalinos, a fim de identificar quais estarão mais aptos para posteriores utilizações na descoloração e, portanto, na descontaminação dos efluentes têxteis.

Paranhos (2007), estudando a capacidade de descoloração dos compostos de baixa massa molar de *Trogia buccinalis*, *Peniophora cinerea* e *Trametes villosa*, observou que os fungos cresciam melhor no meio complexo e apresentavam maior atividade enzimática e de quelantes de Fe^{3+} do que no meio basal, mas quando obteve os CBMM a atividade dos quelantes se igualavam. Também constataram que nos extratos obtidos no meio basal com pH inicialmente alcalino, os CBMM apresentaram descoloração dos corantes reativos azul, vermelho e amarelo, enquanto que no meio complexo com pH 5, a descoloração ocorreu apenas com o corante azul (PARANHOS; VITALI, dados não publicados)*.

Parte do grupo de pesquisa envolvido nesse projeto dedica-se a avaliar a capacidade de descoloração desses corantes *in vivo*, analisando-a pela atuação de todo o metabolismo fúngico, com o foco na atividade enzimática e otimização do meio (OLIVEIRA et al., 2010; YAMANAKA, et al., 2008).

Com o objetivo de todo grupo trabalhar com o mesmo meio de cultura para o desenvolvimento do projeto, este estudo visou avaliar a influência do meio basal simplificado à atividade de quelantes de Fe^{3+} , seu comportamento em pH alcalino e a sua contribuição na descoloração dos corantes reativos.

*Relatório CNPQ-PIBIC, 2008.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico: Utilizou-se a linhagem de fungo basidiomiceto de podridão branca *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541, depositado na coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Brasil). A cultura foi mantida, a 4 °C, em EMA (extrato malte ágar), constituído de: extrato de malte 2%; peptona 0,1%; ágar 1,5%; Glicose 2 %.

Corantes sintéticos: Empregou-se os corantes têxteis reativos Cibacron Azul Brillhante H-GR e Vermelho FN-2BL, fornecidos por Ciba-Geysse. Os corantes foram preparados na concentração de 0,2g/L com pH 10, com NaOH 2N, e hidrolizados a 80 °C, durante 4 hora. Os picos máximos de absorção dos corantes foram obtidos por varredura em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS) no intervalo de comprimento de onda de 400-800 nm.

Condição de cultivo: *P. cinerea* foi inoculados com três discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial de sete dias de incubação, em frascos de erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio basal. O experimento foi dividido em dois lotes, um com meio basal e outro com meio basal sem solução de vitaminas - simplificado (MACHADO et al., 2006). Novamente cada lote de meio foi dividido, sendo que metade dos frascos desses lotes tiveram os pHs modificados para alcalino (8,5) no momento da inoculação e a outra metade manteve seu pH ótimo (5,5). A duração do cultivo foi de 15 dias, a 25±2°C. Após o período de cultivo realizou-se o método CAS no extrato bruto e nos compostos de baixa massa molar.

Método CAS para detecção de atividade de quelante de Fe³⁺: Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe³⁺, aplicou-se o método universal CAS (Cromo Azurol S) (SCHWYN; NEILAND 1987),

baseado na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador CAS e do quelante produzido pelos fungos.

Obtenção dos compostos de baixa massa molar (< 5 kDa): Após filtração dos cultivos, os extratos do fungo foram concentrados dez vezes por liofilização e foram ultrafiltrados utilizando-se membranas de corte 5 kDa (marca VIVASPIN 15) à 3950 rpm por 99 min (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R).

Descoloração *in vitro*: Solução de cada corante a 0,01% foi incubada nos CBMM 1:1 (v/v), por 72 horas, a 25 °C. Como controle usou-se a mistura de corante com meio de cultura sem inóculo 1:1 (v/v).

Capacidade de descoloração dos corantes: Avaliada pela redução da absorbância do comprimento de onda característico de cada corante (530 nm corante vermelho e 640 nm corante azul).

Teste de degradação dos corantes: Avaliada pela razão entre as leituras da absorbância em dois comprimentos de onda em espectrofotômetro, segundo o método proposto por Glenn e Gold (1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base em estudos anteriores, os quais afirmam que a produção dos quelantes de ferro e seu potencial de quelação são influenciados pela composição e pH do meio, testou-se a produção de quelantes de ferro em duas variações do meio basal e seu comportamento em pH alcalino (MELO, 2009; PARANHOS; VITALI, dados não publicados).

A retirada da solução de vitaminas e a alcalinização inicial do pH nos dois meios não interferiram na capacidade de acidificação do pH por *P. cinerea* para o seu pH ótimo. O pH ficou entre 3,6 nos cultivos sem alteração de pH e 4 para cultivos com alcalinização do meio. Esse resultado é um indicativo da produção de ácidos orgânicos por *P. cinerea* nas condições de cultivo utilizadas.

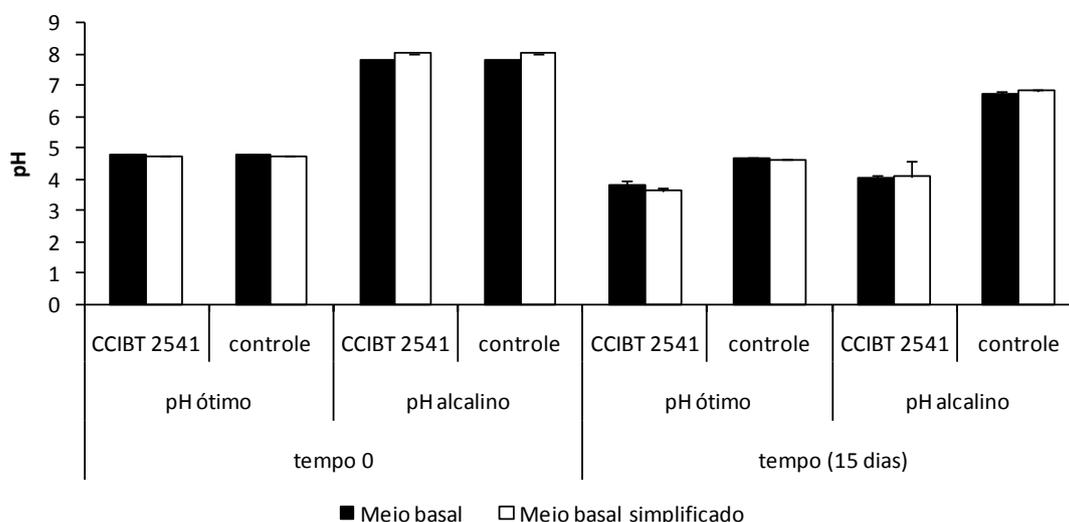


Figura 1: Variação dos valores médios do pH de *P. cinerea* CCIBT 2541 incubado em meio basal e meio basal simplificado com pH ótimo do meio e pH inicialmente alcalino, a 25°C, durante 15 dias

A acidificação do meio é decorrente da produção de ácidos orgânicos formados pelo metabolismo de açúcares, tendo a propriedade de acidificar o meio (AGUIAR et al., 2006; MOORE- LANDECKER, 1996) e assim modificar o pH para

seu pH ótimo de crescimento e metabolismo (MOREIRA-NETO et al., 2009). Kirk (1978) comprovou que pH em torno de 4,5 propicia um crescimento ótimo para o fungo *Phanerochaeta chrysosporium* e essa faixa de pH ácido é ótima para o crescimento de outros grupos de fungos (SWANY; RAMSAY, 1999).

Teneke e colaboradores (2001) observaram alterações no valores do pH inicial dos meios de cultura, durante o crescimento de vários fungos basidiomicetos. Esses autores concluíram que o pH do meio tende a aumentar quando o pH inicial é abaixo de 4 e o oposto foi observado quando o pH inicial do meio acima de 4,5. Corroborando, Galhaup et al. (2002) notou a diminuição do pH inicial (5,0 para 3,6) durante a fase de crescimento de *Trametes pubescens*. *Ganoderma australe*, *Polyporus brumalis* and *P. ciliates* também apresentaram redução no pH do meio, de 6,7 para 4,5, durante o período de crescimento (RIGAS ; DRITSA, 2006). Esse comportamento também foi observado no presente trabalho nos cultivos com pH inicial de 8.

O pH alcalino é o principal fator agravante na utilização de fungos basidiomicetos na biorremediação de efluentes, pois está associado, entre outros fatores, à disponibilidade de nutrientes na forma iônica e à solubilidade de íons metais, os quais podem ser altamente tóxicos aos fungos. As enzimas as quais atuam no sistema lignolítico apresentam um pH ótimo para atuação que, de maneira geral, situa-se entre 3,5 e 7 (MOREIRA-NETO et al., 2009). Valores altos de pH acarretam ainda um comprometimento no crescimento fúngico, pois muitos metais que são empregados como co-fatores, como por exemplo Cu^{2+} que ativa as enzimas lacase e tirosinase, tornam-se insolúveis, afetando muitas vias metabólicas (MOREIRA- NETO, 2006; GALHAUP et al., 2002; GUGLIOTTA, 2001; KIRK et al., 1978).

No presente estudo, o pH não proporcionou mudanças na fisiológicas do fungo, já que esse conseguiu mudar o pH do meio para o seu pH ótimo metabólico. Estudos anteriores realizados por Paranhos (2007), mostram a eficiência desse mesmo fungo em modificar o pH do meio.

É sugerido que durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição parda o ácido oxálico produzido atue solubilizando Fe^{3+} e, do

mesmo modo, prevenindo, pela quelação do metal, a geração de ROS pela reação de Fenton próximo a hifa fúngica (GOODELL et al., 1997; ARANTES et al., 2009). Por outro lado, o rápido decréscimo do pH na fase inicial de crescimento, em condições de deficiência de ferro no meio de cultura, pode ser um mecanismo (acidificação do meio para posterior assimilação do ferro por redução) empregado pelo fungo para superar o problema de baixas concentrações de ferro no meio.

Produção de quelantes de ferro

A produção de quelantes de ferro do extrato bruto do fungo *P. cinerea* teve o mesmo comportamento nos dois meios de cultura testado. Em ambos houve maior produção de quelantes no meio, inicialmente, alcalinizado (20% meio basal e 18% meio basal simplificado) (Figura 2).

A produção de quelantes de ferro nos compostos de baixa massa molar é maior do que no extrato bruto, pelo fato dos CBMM ser mais concentrado que o extrato bruto, devido a ultrafiltração a qual foram submetidos. A produção de quelantes no CBMM de *P. cinerea* (Figura 3) foi similar a observada por Paranhos e Vitali (dados não publicados), quando cultivado este mesmo fungo em ME 2% com pH ótimo (74% em 30 dias de cultivo).

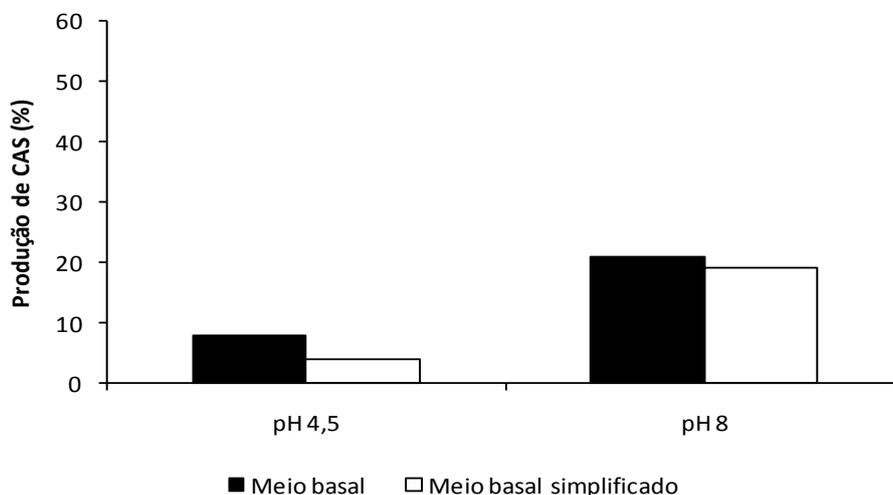


Figura 2: Porcentagem da produção de CAS do extrato bruto de *Peniophora cinerea* CCIBT 2541 cultivado meio basal e meio basal simplificado, após 15 dias de cultivo

Neste trabalho observa-se que a produção de quelantes de ferro entre os CBMM foi de 53% pH ótimo e 50% pH alcalino, em meio simplificado. No meio basal não foi detectada a presença de quelantes de ferro quando cultivado em pH ótimo, acredita-se que isso ocorra pelo fato desse fungo ser produtor de exsudado, composto de coloração castanha, que interfere na análise por espectrofotometria. Em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa não foi notada a presença de exsudado nos extratos e frações com pH alcalinizado, isto pode ocorrer em virtude de alguma reação causada pela presença NaOH 2N (utilizado na alcalinação do meio) (MELO, 2009; PARANHOS, 2007).

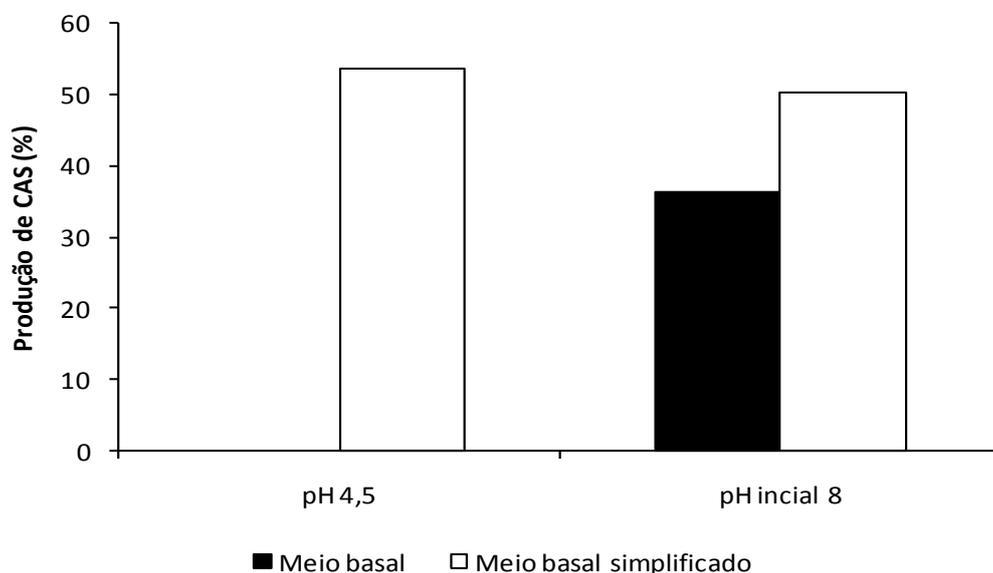


Figura 3: Porcentagem da produção de CAS dos compostos de baixa massa molar produzidos por *Peniophora cinerea* CCIBT 2541 cultivado meio basal e meio basal simplificado, após 15 dias de cultivo

A ausência da solução de vitaminas e Tiamina HCl no meio de cultura não teve consequência direta na produção dos compostos de baixa massa molar, muito pelo contrário, o meio basal simplificado indicou maior produção de CAS (51%) do que em meio basal (36%). Considera-se que a produção de quelantes de ferro está mais relacionada com a quantidade de ferro disponível no meio de cultura, do que com os nutrientes do meio.

Arantes (2008) ao estudar fungos de podridão branca e parda, constatou maior produção de quelantes (hidroxamatos e catecolatos) quando os fungos crescem mais lentos (condições de restrição de ferro) do que quando crescem rápidos (condições de suplementação com ferro). O fato está de acordo com a afirmação feita por Neilands (1984), que elevada concentração de ferro no meio de cultivo, normalmente, resulta em excelente crescimento do micro-organismo, mas somente modesta produção de quelantes específicos de Fe^{3+} (sideróforos). Além disso, os resultados indicam que a produção de catecóis e hidroxamatos em fungos de decomposição branca e parda é, diferentemente, regulada por ferro.

Teste de degradação dos corantes

O corante azul brilhante H-GR demonstrou descoloração pelos compostos de baixa massa molar produzidos por *P. cinerea* nos dois meios de cultura e suas maiores taxas de descoloração ocorreram com 24 horas de incubação (Figura 4). Os CBMM produzidos no meio basal, sem alteração de pH apresentaram maior descoloração do corante, 36,31% em relação aos obtidos em cultivos com o pH inicial alcalinizado 24,15%. Resultados similares foram verificados por Paranhos (2007), os CBMM de *P. cinerea* cultivado em meio basal com pH inicialmente alcalino apresentou 23% de descoloração do corante azul em 26 horas.

Os CBMM produzidos no meio basal simplificado descoloriram 11% e aproximadamente 21%, em pH sem e com alcalinização, respectivamente.

Moreira-Neto e colaboradores (2009) notaram que o pH inicial do meio de cultura influenciou, diretamente, na descoloração *in vitro* do corante antraquinônico RBBR. Os extratos enzimáticos de *L. crinitus* e *P. castanella* apresentaram maior taxa de descoloração quando cultivado em meio com pH inicial 4,5, e 5,9, respectivamente.

No presente estudo observou-se que o pH inicial do meio de cultivo não

teve influência direta na degradação dos corantes reativo azul pelo CBMM produzidos por *P. cinerea*, já que esse demonstrou degradação nas duas faixas de pH.

De acordo com Glenn e Gold (1983) a degradação de corantes pode ser monitorada durante o cultivo do fungo em meio líquido, por meio da razão entre dois comprimentos de onda característicos do corante (para o corante azul 640 e 530 nm) (Figura 4). Quando as razões se mostram constante ao longo do tempo, caracteriza-se a não alteração da molécula e quando a razão for decrescente, pode-se inferir que houve degradação.

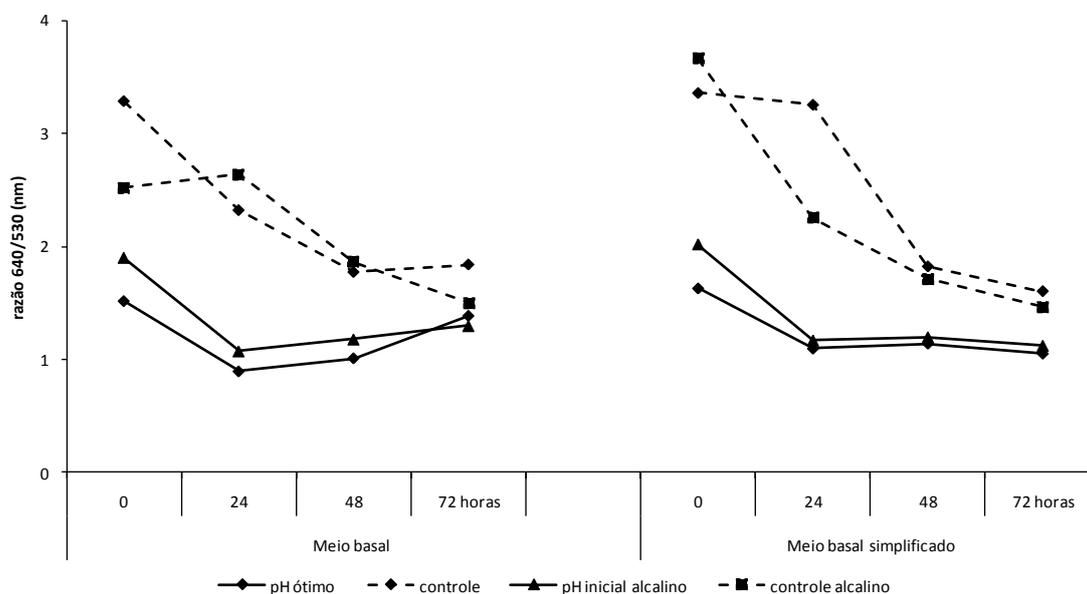


Figura 4: Variação da razão da absorvância do corante azul pelos CBMM produzidos por *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541) nos comprimentos de onda 630 e 530 nm, cultivado meio basal e meio basal simplificado, após 15 dias de cultivo, durante 72 horas de reação

Assim como o corante Azul, o corante Vermelho exibiu melhor descoloração com 24 horas de incubação. Os compostos de baixa massa molar cultivado em meio basal modificado teve 14,80% descoloração e em meio basal 6,41%, com pH ótimo. Não foi detectada descoloração do corante vermelho quando incubado nas duas variações de meio basal com pH inicialmente alcalino. Resultados obtidos no teste de degradação proposto por

Gleen; Gold (1983), confirmam esse dado, já que o tratamento com *P. cinerea* teve o mesmo comportamento do tratamento controle (Figura 5).

Diversos estudos têm sido realizados com fungos de podridão branca na degradação de corantes sintéticos têxteis. Younes e colaboradores (2006), observaram a descoloração de diversos corantes têxteis, entre eles, Neolane pink (88%), Neolane Blue (84%), Pink Bengal (49%) e Basic red (30), utilizando apenas a lacase purificada do *Perreniporia tephropora*.

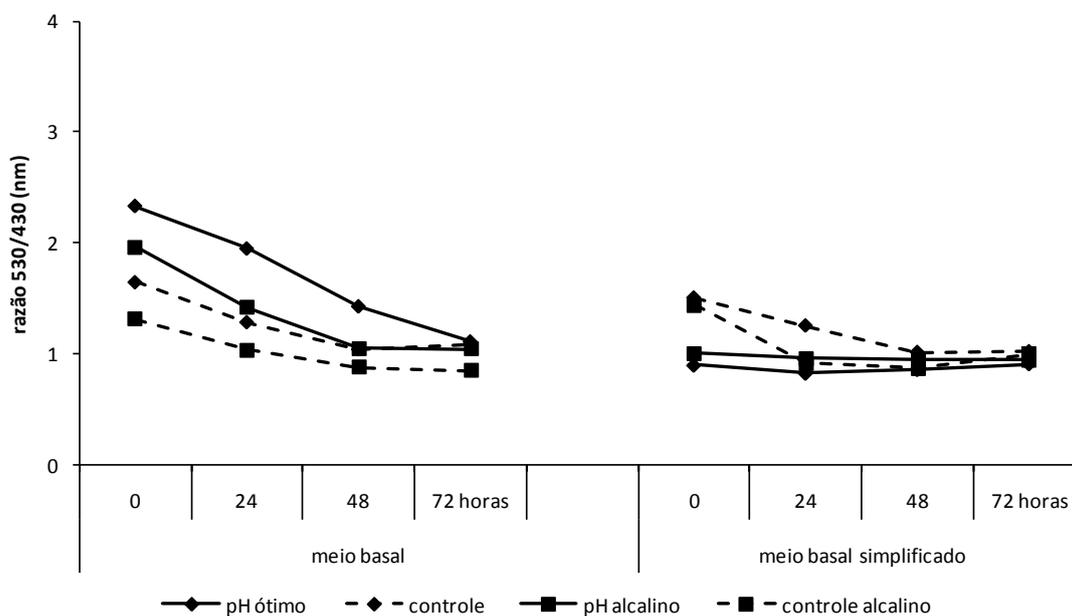


Figura 5: Variação da razão da absorbância do corante vermelho pelos CBMM produzidos por *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541) nos comprimentos de onda 530 e 430 nm, cultivado meio basal e meio basal simplificado, após 15 dias de cultivo, durante 72 horas de reação

Contudo, sabe-se que apesar do grande potencial de degradação das enzimas ligninolíticas, produzidas por esses fungos, a taxa de degradação dos corantes recalcintrantes é intensificada quando se usa todo o metabolismo do fungo.

Boer e colaboradores (2004), observaram a mineralização dos corantes têxteis Amido Black, Congo Red, Trypan Blue, Methyl Green, RBBR, Methyl Violet, Rthyl Violet e Poly R470, após 18 dias de incubação do fungo *Lentinus edodes*.

CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, nesse trabalho, comprova-se que as alterações no meio basal, retirada da solução de vitaminas e da tiamina HCl não alteraram os resultados dos estudos anteriores com este meio, possibilitando assim a utilização do meio basal simplificado na realização das próximas etapas do estudo.

Os compostos de baixa massa molar demonstraram manter sua capacidade em degradar o corante Azul e Vermelho no meio basal simplificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B. AND FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

ARANTES, V.; QIAN, Y.; MILAGRES, A. M. F.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by a biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: Implications for brown rot decay. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 478-483, 2009.

ARANTES, V. 2008. **Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, 2008.

BALAN, D. S.; MONTEIRO, R. T. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n.2, p. 215- 242, 2006.

BOER, C. G., OBICI, L., DE SOUZA, C. G., AND PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Biores. Technol.** v. 94. p. 107–112, 2004.

GALHAUP, C.; GOLLER, S.; PETERBAUER, C. K.; STRAUSS, J.; HALTRICH, D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin- Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOODELL, B.; JELLISON, J.; LUI, J., DANIEL; G., PASZCZYNSKI, A.; FEKETE, F.; KRISHNAMURTHY, S.; JUN, L.; XU, G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas – Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201-221, 2006.

KIRK, T. K. et al. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

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

MACHADO, K. M. G. ; COMPART, L. C. A. ; MORAIS, R. O. ; ROSA, L. H. ; SANTOS, M. H. . Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.

MACHADO, K. M. G ; MATHEUS, D. R. Biodegradation of Remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473. 2006.

MACHADO, K.M.G., MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005b.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Ed.). **Zigomicetos**,

basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente, 1998. 184p.

MELO, J. P. **Avaliação da degradação de corantes têxteis reativos da indústria têxtil por quelantes de ferro produzidos por fungos basidiomicetos.** São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V.; MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by White and Brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 562-565, 2002.

MOORE- LANDECKER , E. **Fundamentals of the fungi.** 4th ed New Jersey. Prentice- Hall, Inc.. 1996.

MOREIRA-NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1075-1082, 2009.

MOREIRA- NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** 2006. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

NEILANDS, J. B. Methodology of siderophores. Siderophores from microorganisms and plants. **Structure and Bonding**, v. 58, p. 1–24, 1984.

OLIVEIRA, L. H. S.; BARRETO, M. B; VITALI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, v.33, p. 85-99, 2010.

PARANHOS, A. P. S. **Avaliação da produção de quelantes de ferro por fungos basidiomicetos e degradação de corantes da indústria têxtil.** São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2007.

RIGAS, F.; DRITSA, V. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, 120- 124, 2006.

SCHWYN, B.; J. B. NEILANDS. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

SWAMY, J. ; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and microbial technology**, v. 24, p. 130 - 137, 1999.

TEKERE, M.; MSWAKA, A.; ZVAUYA, Y. R.; READ, J. S. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 420–426, 2001.

TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. AND DURÁN, N. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 97-212, 2005.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. ; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 1999.

YOUNES, S. B.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1033–1042, 2007.

ZHAO, X & HARDIN, I. R. 2007. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, 73: 322- 325.

(*) De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CAPÍTULO II

Detecção dos compostos de baixa massa molar produzidos por fungos basidiomicetos de podridão branca

Ana Paula Soares Paranhos^{1,2*}, Vera Maria Valle Vitali¹, Adriana de Melo Gugliotta¹

¹ Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

² Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 5067-6067. E-mail:paulinhatin@hotmail.com

RESUMO

Fungos basidiomicetos, causadores de podridão branca da madeira, possuem a capacidade de transformar e até mineralizar, além da lignina, uma variedade de poluentes orgânicos resistentes à degradação, devido a presença do aparato enzimático produzido por estes fungos. Estudos sobre a biodegradação da madeira evidenciaram que as enzimas lignocelulolíticas não são capazes de penetrar na estrutura da parede celular nas fases iniciais da degradação em razão de seu alto peso molecular, assim sendo, sugere-se que os compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo poros para futuros ataques enzimáticos. Com o objetivo de conhecer os mecanismos envolvidos na degradação de corantes têxteis, mecanismo degradativo similar a biodegradação da madeira, este trabalho estudou a composição dos compostos de baixa massa molar produzidos pelos fungos de podridão branca *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 e *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541. Esses fungos foram incubados em meio basal, no escuro, a 25°C, durante 21 dias, sendo que, em intervalos de sete dias, triplicatas foram concentradas e ultrafiltradas (membranas de corte 5 kDa) para obtenção dos compostos de baixa massa molar em diferentes idades fisiológicas. Essas frações foram caracterizadas quanto à produção de quelantes de ferro, tipo de quelante - catecol e/ou hidroxamato e atividade redutora de Fe³⁺. Ambos os fungos apresentaram produção de quelantes de ferro significativa (51% *Trogia buccinalis* e 45% *Peniophora cinerea*, após 21 dias de cultivo), caracterizadas como tipo catecol, *Peniophora cinerea* (0,65 mM) com idade fisiológica de 14 dias, e *Trogia buccinalis* (0,57 mM) aos 21 dias. Contudo, os fungos apresentaram baixa atividade redutora de ferro, produção média de 4µM de Fe³⁺ reduzido.

Palavras-chave: Quelantes de ferro; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Reação de Fenton; Atividade redutora de Fe³⁺.

ABSTRACT

Detection of low molecular weight compounds produced by white rot basidiomycetes

Studies on wood biodegradation showed that lignocellulolytic enzymes are not able to penetrate the cell wall structure in the early stages of degradation due to their high molecular weight. Therefore, it is believed that low molecular weight compounds would cause the disruption of cell wall structure in early stages of degradation, opening pores for future enzymatic attack. The understanding of the mechanisms involved in the degradation of textile dyes, this work studied the composition of low molecular weight compounds produced by the white rot fungi *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 and *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541. These species were incubated in basal medium in the absence of illumination at 25 ° C for 21 days. At intervals of seven days, triplicates were concentrated and ultrafiltered (5 kDa cutoff membranes) to obtain low molecular weight compounds in different physiological ages. These fractions were characterized as for their production of iron chelators, chelating type - catechol and/or hydroxamate, and Fe³⁺ reducing activity. Both fungi showed significant production of iron chelators (51% *T. buccinalis* and 45% *P. cinerea*, after 21 days of culture), characterized as type Catechol. *P. cinerea* (0,65 mM) with physiological age of 14 days, and *T. buccinalis* (0,57 mM) at 21 days of cultivation. However, the fungi presented low iron reducing activity (average of 4µM of reduced Fe³⁺).

Keywords: Iron chelators; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Fenton reaction; Fe³⁺ reducing activity.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos estudos têm sido realizados com o intuito de desvendar quais mecanismos são utilizados pelos fungos basidiomicetos na biodegradação da madeira.

Os fungos basidiomicetos de podridão branca possuem a capacidade de metabolizar os componentes da madeira (lignina, celulose e hemicelulose), podendo transformá-los em CO₂ e H₂O. A degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduases, representadas, principalmente, por lacases, manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxidos de hidrogênio, além de compostos intermediários de baixa massa molar (MOREIRA-NETO, 2006).

Estudos sobre os compostos de baixa massa molar (CBMM) obtiveram considerável expressão nos últimos anos, por explicarem como ocorre o começo da degradação da madeira. Isso porque, apesar do notável conhecimento adquirido a respeito do papel das enzimas na biodegradação dos constituintes da madeira, sabe-se que o processo de biodegradação por fungos não pode ser explicado, unicamente, com base na ação das diversas enzimas lignocelulolíticas por eles secretadas (ARANTES, 2008).

As enzimas lignocelulolíticas não conseguem de penetrar na estrutura da parede celular, nas fases iniciais da degradação, por causa de seu alto peso molecular (BLANCHETTE et al., 1997). Teorias sugerem que os iniciadores do processo de degradação da parede celular seriam pequenas moléculas que se difundem, facilmente, desde a hifa e penetra nos poros da matriz lignocelulósica. Esses compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos já existentes (GOODELL et al., 1997).

Supõem-se ser os compostos de baixa massa molar os responsáveis pelo processo inicial de degradação da madeira, em virtude de seu baixo peso molar e a capacidade de alguns de quelar Fe^{3+} e reduzi-lo em Fe^{2+} . O Fe^{2+} na presença de peróxido de hidrogênio (reação de Fenton), forma radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), os quais agem de modo oxidante nos constituintes da madeira (GOODELL et al., 1997).

Essa teoria é amplamente aceita para explicar a degradação da madeira não-enzimática de fungos de podridão parda e branca, contudo, desconhece-se sobre as condições ideais para produção dos compostos redutores de ferro, como os parâmetros ambientais influenciam em sua detecção, qual sua participação na degradação e se este é um mecanismo exclusivo desse grupo de fungos.

Com base nesses aspectos, o objetivo desse trabalho foi caracterizar os compostos de baixa massa molar produzidos pelos fungos de podridão branca *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico: Foram utilizadas as linhagens de fungos basidiomicetos de podridão branca *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 e *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727, depositados na coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Brasil). As culturas foram mantidas, a 4°C, em EMA (extrato de malte ágar), constituído de extrato de malte 2%; peptona 0,1 %; ágar 1,5 %; glicose 2 %.

Condição de cultivo: Os fungos foram inoculados com seis discos de 5 mm de diâmetro, com crescimento micelial de sete dias de incubação, em frascos de erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio basal modificado (MACHADO et al., 2006) e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no período de 28 dias. Durante esse período, em intervalos de 7, 14 e 21 dias, lotes de nove frascos com inóculo de cada fungo foram retirados para a obtenção e caracterização dos compostos de baixa massa molar.

Obtenção dos compostos de baixa massa molar (< 5 KDa): Após filtragem dos cultivos, três réplicas de cada fungo foram misturadas, a fim de aumentar o volume final dos compostos de baixa massa molar, totalizando em triplicatas para cada tratamento. Os extratos desses fungos (triplicata) foram liofilizados, ressuspensos em água milliQ a 10% do volume inicial e ultrafiltrados utilizando membranas de corte 5 kDa (marca VIVASPIN 15) a 3.950 rpm por 99 minutos (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R).

Método CAS para detecção de atividade de quelante de Fe^{3+} : Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe^{3+} , empregou-se o método universal CAS (Cromo Azurol S) (SCHWYN; NEILAND

1987), baseado na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador CAS e do quelante produzido pelos fungos.

Atividade redutora de Fe³⁺ : Para a determinação da atividade redutora de ferro aplicou-se o teste de ferrozina por espectrofotometria a 562 nm, como descrito por Stookey (1970), modificado por Aguiar (2008).

Identificação química dos compostos de baixa massa molar

Derivados de Catecol: Para a detecção de compostos com estruturas do tipo catecol utilizou-se o Método de Arnow (1937). Quando há estruturas de tipo catecol elas reagem com ácido nítrico produzindo uma coloração amarela, a qual muda para vermelho-laranja quando o meio reacional torna-se, fortemente, alcalino.

Ácido hidroxâmico: Para a detecção de compostos com estrutura de hidroxamato empregou-se o Ensaio de Csáky (1948). A reação se baseia na oxidação da hidroxilamina a nitrito em meio ácido, que é, então, estimado pela reação de cor com ácido sulfanílico e α -naftilamina.

Análise estatística dos dados: Os dados foram analisados pelo programa estatístico Minitab 15(2011). Os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando foi observado efeito significativo superior ou igual a 95% de probabilidade ($P \leq 0,05$), as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados percentuais transformados na expressão abaixo, de acordo com Vieira e Hoffmann (1989).

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \sqrt{\text{valor em \%} / 100}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Trogia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541) apresentaram queda significativa do pH nos cultivos com 14 e 21 dias de incubação (Figura 1). A acidificação do meio pelos fungos é decorrente da produção de ácidos orgânicos (AGUIAR et al., 2006) formados pelo metabolismo de açúcares presentes no meio de cultura, tendo a propriedade de acidificar o meio (MOORE-LANDECKER, 1996) e assim modificar o pH para seu pH ótimo de crescimento e metabolismo (MOREIRA-NETO et al., 2009).

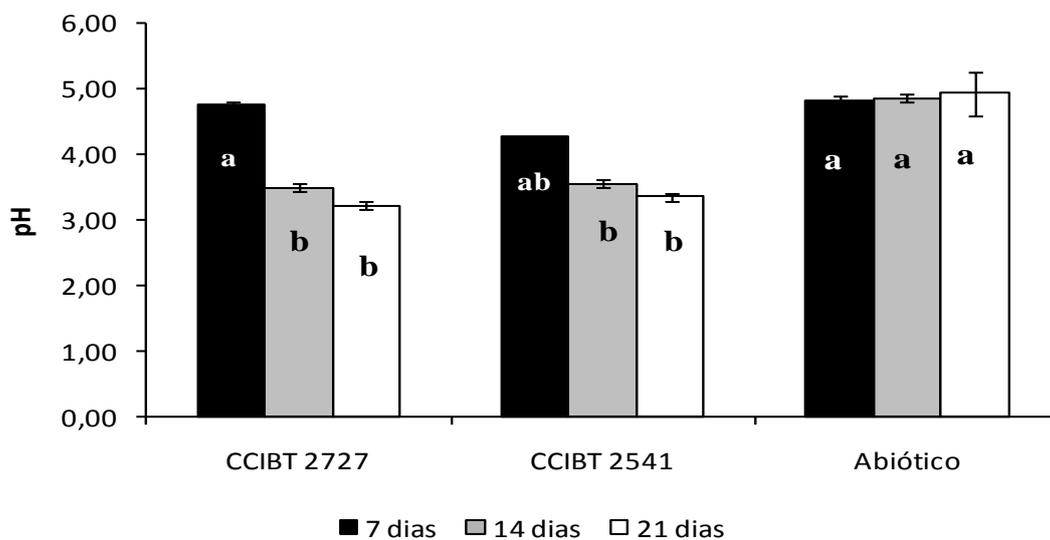


Figura 1: Variação do pH durante os cultivos de *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea* em meio basal incubados no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 21 dias. Letras iguais não diferem, significativamente, ao nível de confiança de 95%. Barras de erro \pm desvio padrão da média

Vários ácidos orgânicos produzidos por micro-organismos, podem atuar como compostos quelantes de ferro, como ácido oxálico e o ácido cítrico. Goodell et al. (1997) e Arantes et al. (2009), sugerem que durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição parda o ácido oxálico

produzido atua solubilizando Fe^{3+} e, também prevenindo a geração de ROS pela reação de Fenton próximo a hifa fúngica, por meio da quelação de metais.

O decréscimo do pH, na fase inicial, de crescimento em meios de cultura com deficiência de ferro, pode ser um mecanismo (acidificação do meio para posterior assimilação do ferro via redução) que o fungo emprega para superar o problema de baixas concentrações de ferro no meio (ARANTES et al., 2009; GOODELL et al., 1997).

Produção de compostos quelantes de Fe^{3+}

A capacidade de quelação dos fungos basidiomicetos de podridão parda foi bastante elucidada e descrita, principalmente, o mecanismo de quelação do *Gloeophyllum trambeum*, precursor dos estudos com compostos de baixa massa molar. Contudo, nas últimas décadas, estudos com fungos de outros grupos têm demonstrado a capacidade de quelação do Fe^{3+} dos fungos de podridão branca semelhante a dos fungos de podridão parda (GOODELL et al., 1997). Arantes; Milagres (2006) ao estudarem os fungos de podridão parda, *Wolfiporia cocos* e de podridão branca *Perenniporia medulla-panis*, perceberam atividade de quelação similar entre ambos, diferenciando apenas o meio de cultura no qual foram cultivados. *P. medulla-panis* apresentou maior atividades de quelação de Fe^{3+} (85,8%) quando incubados por 30 dias, do que os fungos estudados neste trabalho (*P. cinerea* - 54% e *T. buccinalis* - 51,6%) quando incubados por 21 dias (Figura 2).

Segundo Santiago (1999), ambientes com pHs ácidos favorecem a redução de ferro e a produção de quelantes. Os resultados obtidos no trabalho corroboram com essa afirmação, sendo que os cultivos com sete dias de incubação de *T. buccinalis* e *P. cinerea*, com pH próximo a 4,5, apresentaram atividade de quelação de Fe^{3+} (% CAS) de 15% e 18,5%, respectivamente. Quando incubados por 21 dias, pH próximo de 3,5, a atividade observada foi de 51% e 45% respectivamente (Figuras 1 e 2).

A análise da atividade de quelação de Fe^{3+} , obtida em porcentagem da atividade de CAS, é baseada na competição por Fe^{3+} entre os quelantes não-complexados presentes nos compostos de baixa massa molar e o corante indicativo CAS. Quando o quelante sequestra o Fe^{3+} do corante CAS a coloração do meio começa a modificar-se para tons rosa ou alaranjado. Essa análise é quantificada por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda, característico do corante CAS. Os fungos *P. cinerea* e *T. buccinalis* são produtores de exsudados acastanhados que interferiram na leitura da quantificação da quelação de Fe^{3+} , com 14 dias de incubação, subestimando os resultados. Essa produção de exsudados já foi observada em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, Bonfim e Vitali (dados não-publicados) analisando o *P. cinerea* em degradação de organoclorados, Paranhos (2007) observando o extrato bruto de *P. cinerea* na degradação de corantes têxteis, e Melo (2009), estudando o extrato bruto de *P. cinerea* e *T. buccinalis* na degradação de corantes têxteis, em meio de cultura complexo e basal.

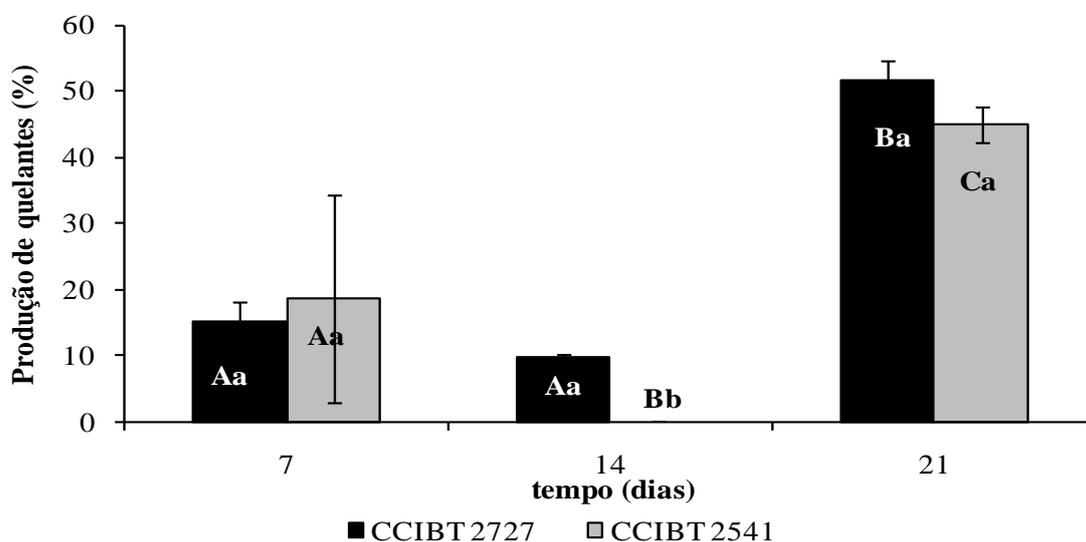


Figura 2: Produção de CAS em porcentagem obtida pelas frações de baixa massa molar de *T. buccinalis* e *P. cinerea* quando incubados em meio basal simplificado, a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 21 dias. Letras iguais maiúsculas (entre o fungo) e minúsculas (por idades fisiológicas de cada fungo) não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%. Barras de erro \pm desvio padrão da média

O cultivo com 21 dias de incubação, indicou uma maior atividade de quelantes (*T. buccinalis*-51% e *P. cinerea*- 45%) (Figura 2) do que com sete dias (em torno de 15%, sem diferença significativa entre os fungos), uma possibilidade para esse resultado é o maior tempo de incubação, a disponibilidade nutricional no meio, diminuiu, inclusive de ferro, estimulando a produção de quelantes de ferro pelo metabolismo fúngico. *P. cinerea* apresentou o mesmo comportamento quando cultivado em meio complexo (PARANHOS, 2007). Esses resultados estão de acordo com a afirmação de Moore- Landecker (1996), de que os fungos secretam quelantes de ferro quando crescem em condições de deficiência do mesmo.

Identificação dos compostos de baixa massa molar quelantes de Fe³⁺

Estudos anteriores caracterizavam a maioria dos compostos de baixa massa molar produzidos por diversos grupos de fungos como pertencente do grupo dos hidroximatos (WINKELMANN, 2007; RENSHAW et al., 2002). Entretanto, estudos sobre a degradação da madeira com fungos de podridão parda, *Gloeophyllum trabeum*, isolaram quelantes de metais, tipo catecol fenólico e benzóico, com capacidade de reduzi-los sem participarem do metabolismo interno dos fungos, sugerindo um novo papel para esses quelantes de metais (GOOLDELL et al., 1997). Quelantes tipo catecol redutores de Fe³⁺ foram encontrados na degradação da madeira de “palo podrido” (FERRAZ et al., 2001); degradação da madeira por *Ceriporiopsis subvermispora* (AGUIAR, 2008) ou os dois tipos: catecol e hidroxamato, quando estudaram a potencialidade desses quelantes produzidos por fungos de podridão parda e branca no branqueamento do efluente Kraft (MILAGRES et al., 2002) e produção de quelantes de metal em ectomicorrizas usadas em plantio de Pinus (MACHUCA et al., 2007). Arantes e Milagres (2006a), observaram que a produção de derivados de catecóis e hidroxamatos em fungos de decomposição branca e parda é diferentemente regulada por ferro e pelo meio de cultura.

T. buccinalis e *P. cinerea*, estudados neste trabalho, produziram quelantes específicos de Fe^{3+} , tipo catecol ($P \leq 0,07$) (Figura 3). *P. cinerea* mostrou pico de produção de derivados de catecol (0,65 mM) com idade fisiológica de 14 dias, e *T. buccinalis* aos 21 dias (0,57 mM). Ambos apresentaram diferença significativa na produção de catecol durante o período de cultivo (Figura 3).

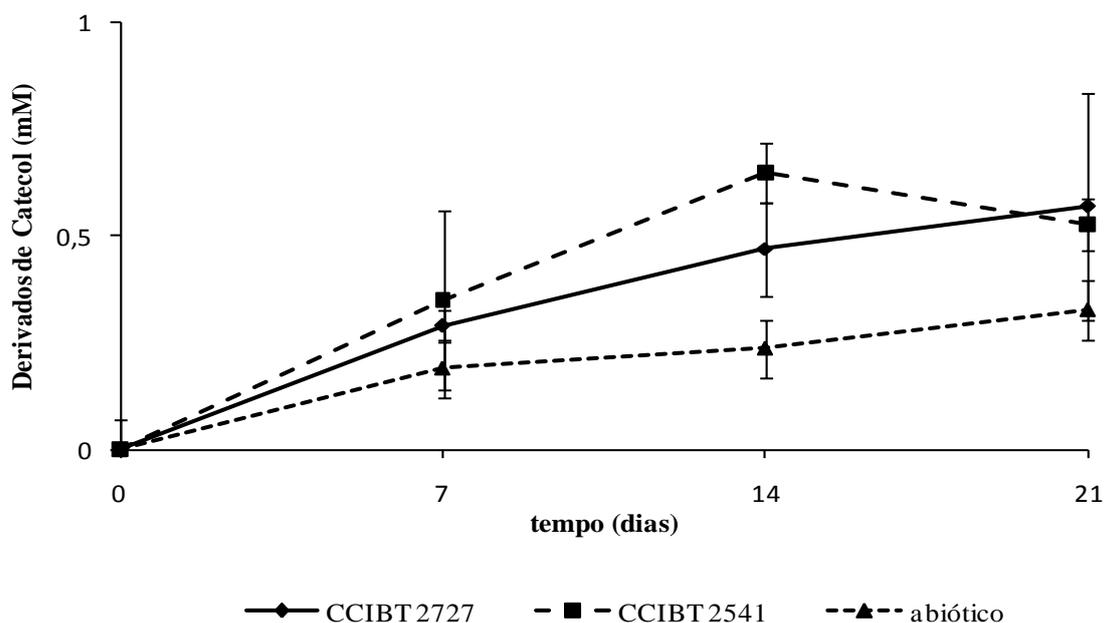


Figura 3: Quantificação de quelantes tipo catecol obtida nos compostos de baixa massa molar de *T. buccinalis* e *P. cinerea* incubados em meio basal, a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 21 dias. Barras de erro \pm desvio padrão da média.

Os resultados obtidos neste trabalho foram 10 (dez) vezes superior aos obtidos por Arantes e Milagres (2006) quando incubado *P. medulla-panis* ($21 \mu\text{M}$), em meio com adição de ornitina-celulose que estimula a produção deste tipo de quelante para esse fungo. Possivelmente, esses resultados foram superiores porque as análises realizaram-se em ambiente escuro e pelas características fotossensíveis desses compostos (MOREIRA-NETO, comunicação pessoal).

A produção de quelantes tipo hidroxamato (Figura 4) não foi significativa ($P \leq 0,05$). Foi observado em cultivos enriquecidos com diferentes fontes de carbono com *P. medulla-panis*, sendo que a fonte de carbono que favorecia a produção de derivados de hidroxamato não favorecia a produção de derivados de catecol (ARANTES; MILAGRES, 2006).

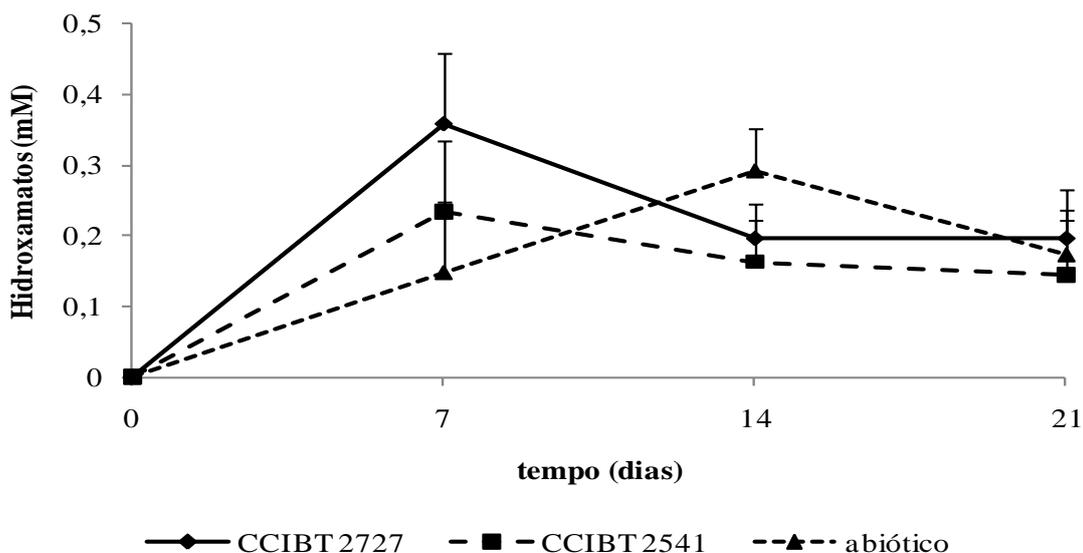


Figura 4: Quantificação de quelantes tipo hidroxamato obtida nos compostos de baixa massa molar de *T. buccinalis* e *P. cinerea* quando incubados em meio basal, a $25^{\circ}+2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 21 dias. Barras de erro \pm desvio padrão da média

Atividade redutora de Fe^{3+}

De acordo com a revisão de Goodell e colaboradores (1997), um íon, como Fe^{3+} , reage com derivados de catecol por meio de um mecanismo de duas etapas com a formação intermediária de um radical semiquinona. Esse radical é estabilizado por sua estrutura de ressonância e reage com o oxigênio molecular para formar um radical peroxil, como espécies reativas de oxigênio. A reação se inicia quando o ácido 2,3-di-hidroxibenzoico (DHBA) complexa-se com o Fe^{3+} . Posteriormente esse complexo é oxidado por mais um Fe^{3+} adicional para formação de semiquinonas intermediárias com a redução simultânea do ferro (Figura 5).

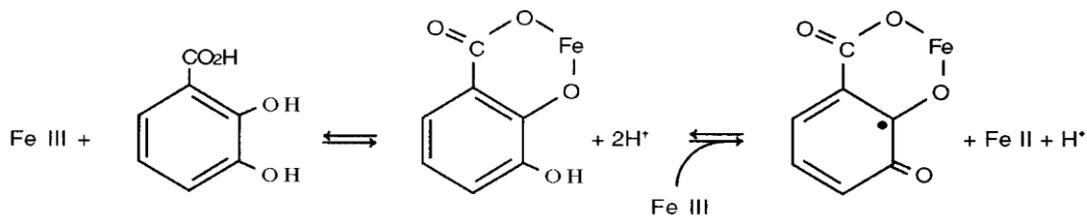


Figura 5: Mecanismo proposto para redução de Fe^{3+} com formação intermediária de semiquinonas e geração de radicais hidroxil.
Fonte: Goodell et al., 1997

Os compostos de baixa massa molar (< 5kDa) de *P. cinerea* e *T. buccinalis* apresentaram em torno de $4\mu\text{M}$ de Fe^{3+} reduzido ($P < 0,05$) (Figura 6). Esses valores são baixos quando comparados aos valores dos CBMM obtidos no cultivo de *P. medulla-panis*, em torno de $23\mu\text{M}$ (ARANTES; MILAGRES, 2006a).

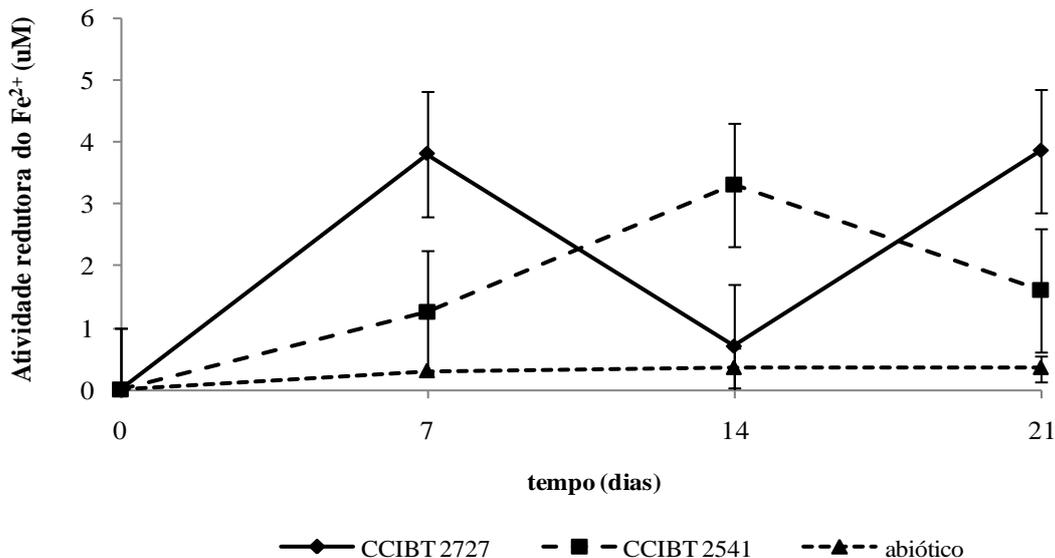


Figura 6: Atividade redutora de Fe^{3+} obtida pelas frações de baixa massa molar de *T. buccinalis* e *P. cinerea* incubados em meio basal, a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 21 dias. Barras de erro \pm desvio padrão da média

Acredita-se que, neste trabalho, a quantificação da atividade redutora do Fe^{3+} foi subestimada pelo método utilizado, o qual se baseia na complexação dos Fe^{2+} pela ferrozina. O peróxido de hidrogênio produzido pelos basidiomicetos pode ter reagido com os Fe^{2+} , pela reação de Fenton (Figura 7),

diminuindo a concentração de Fe^{2+} complexados a ferrozina nas amostras analisadas.

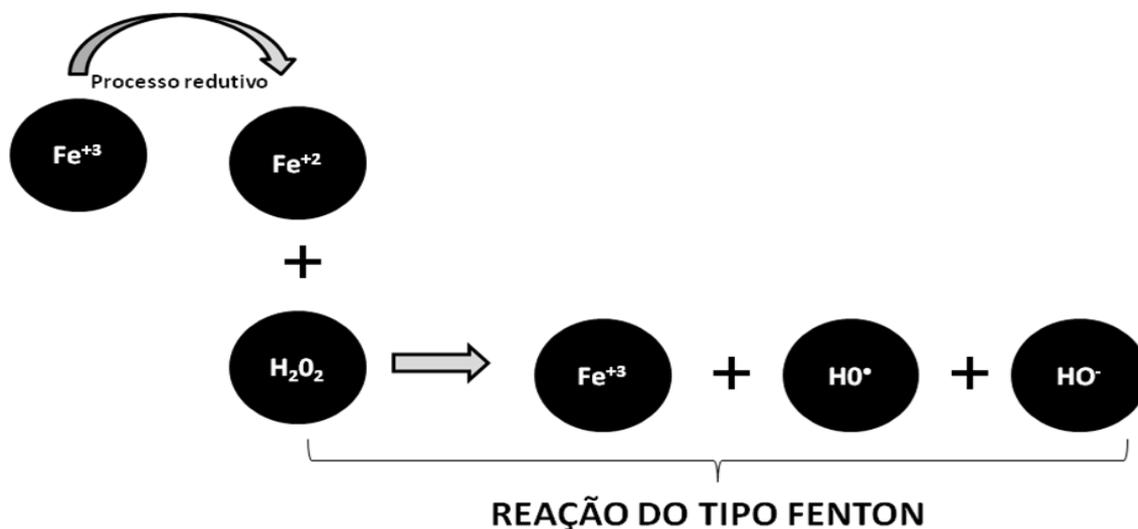


Figura 7: Mecanismo da reação de Fenton.

Melo (2009) e Paranhos (2007) em estudos com *T. buccinalis* e *P. cinerea* ponderaram a predominância da atividade de enzimas peroxidases por esses fungos e a capacidade de descoloração dos corantes reativos por seus compostos de baixa massa molar. De acordo com a revisão de Aguiar (2008), nos estudos de Kerem e colaboradores (1999) foi examinada a formação de H_2O_2 a partir da reação entre 2,5-dimetoxi-hidroquinona e Fe^{3+} formando um radical semiquinona que utiliza O_2 ou Fe^{3+} como acceptor de elétrons, gerando uma benzoquinona e H_2O_2 (Figura 8). O próprio autor e colaboradores observaram que o íon Cu^{2+} ao ser reduzido também decompõe H_2O_2 a radical hidroxila (AGUIAR et al., 2007).

Sabe-se que além dos quelantes de metal, os peptídeos também são capazes de reduzir o Fe^{3+} . Entretanto, ensaios para quantificar a atividade redutora de peptídeos não foram realizados, pela baixa concentração de Fe^{2+} .

Arantes (2008) detectou peptídeos com atividade redutora em seus cultivos, contudo, esses não foram os principais agentes redutores produzidos, já que a atividade demonstrada por esses peptídeos foi muito inferior aos níveis constatados nas frações de baixa massa molar (< 5 kDa) antes da precipitação dos peptídeos, sugerindo que a redução ocorreu por outros compostos, como derivados de catecol.

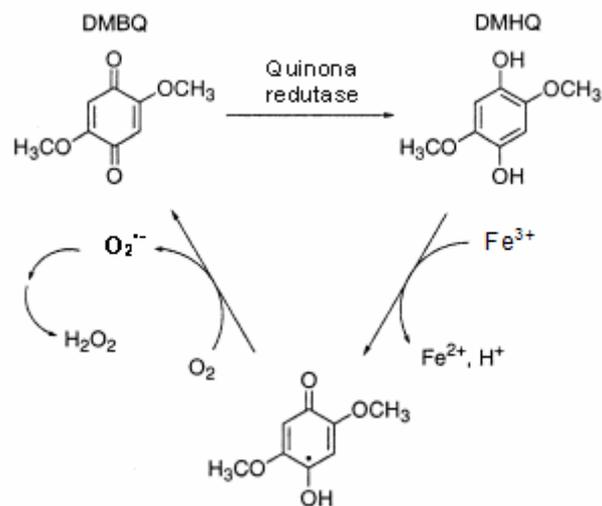


Figura 8: Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum*.

Fonte: AGUIAR, 2008

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os compostos de baixa massa molar produzidos por *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea*, são predominantemente do tipo catecol. Entretanto, apesar da alta concentração de quelantes do tipo catecol encontrada nos compostos de baixa massa molar destes fungos, foi possível observar somente uma baixa atividade redutora de ferro significativa.

Acredita-se que neste trabalho a atividade redutora de ferro foi subestimada pelo método utilizado, visto a comprovada capacidade de degradação destes compostos em degradar moléculas recalcitrantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispora**. 2008. 121f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺ -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from Pinus taeda wood chips biotreated by Ceriporiopsis subvermispora. **Enzyme and microbial technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

ARANTES, V. et al. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: Implications for brown-rot decay. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 478-483, 2009.

ARANTES, V. **Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 887-891, 2006a.

BLANCHETTE, R. A. et al. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, 203–213, 1997.

FERRAZ, A et al. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified “palo podrido” wood samples. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 203-208, 2001.

GALHAUP, C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas – Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

KIRK, T. K. et al. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

MACHADO, K. M. G. ; COMPART, L. C. A. ; MORAIS, R. O. ; ROSA, L. H. ; SANTOS, M. H. . Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.

MACHUCA, A.; PEREIRA, G.; AGUIAR, A.; MILAGRES, A. M. F. Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 7–12, 2007.

MELO, J. P. **Avaliação da degradação de corantes têxteis reativos da indústria têxtil por quelantes de ferro produzidos por fungos basidiomicetos**. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V.; MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 562-565, 2002.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. Inc. 4th ed. New Jersey. Prentice-Hall, 1996.

MOREIRA-NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1075-1082, 2009.

MOREIRA- NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

PARANHOS, A. P. S. **Avaliação da produção de quelantes de ferro por fungos basidiomicetos e degradação de corantes da indústria têxtil**. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2007.

RENSHAW, J.C.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J.; WIEBE, M. G.; LIVEN, F. R.; COLLISON, D.; TAYLOR, R. J. Fungal siderophores: structures, function and applications. **Review. Mycol. Res**, v. 106 (10), p. 1123-1142, 2002.

SANTIAGO, M. F. **Estudos de substâncias de baixa massa molar que mimetizam as fenoloxidasas com aplicações em tratamentos de efluentes industriais**. 1999. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SCHWYN, B.; J. B. NEILANDS. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

STOOKEY, L. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 781- 783, 1970.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

VILLEGAS, M. E. D.; VILLA, P., FRÍAS, A. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. **Revista latinoamericana de microbiologia**, v. 44, p. 112 – 117, 2002.

WINKELMANN, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. **Biometals**, v. 20, p. 379–392, 2007.

(*) De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CAPÍTULO III

Avaliação do potencial de descoloração dos corantes reativos utilizados nas indústrias têxteis pelos compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos basidiomicetos

Ana Paula Soares Paranhos^{1,2*}, Vera Maria Valle Vitali¹, Adriana de Mello Gugliotta¹

¹Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

²Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 5067-6067.

E-mail:paulinhatin@hotmail.com

RESUMO

A degradação dos corantes têxteis por fungos basidiomicetos deve-se ao seu complexo enzimático não-específico, formado, principalmente, por enzimas extracelulares e compostos de baixa massa molar, entre os quais os quelantes de ferro. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade degradativa dos compostos de baixa massa molar, produzidos por fungos basidiomicetos, redutores de ferro, nos corantes reativos têxteis Azul brilhante H-GR e Vermelho FN-2BL e seu comportamento com a alcalinização do pH. *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 e *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 foram incubados em meio basal, no escuro, a 25°C, por 21 dias, sendo que, no período de sete e 21 dias, triplicatas foram concentradas e ultrafiltradas (membranas de corte 5 kDa) para obtenção dos compostos de baixa massa molar, em diferentes idades fisiológicas, os quais se dividiram em dois lotes, cuja metade teve seu pH alterado para 9. Esses compostos foram caracterizados quanto à produção de quelantes de ferro, atividade redutora de Fe³⁺ e o potencial de descoloração de corantes têxteis. A alcalinização dos compostos de baixa massa molar influenciou, diretamente, na produção de quelantes e na capacidade de descolorir os corantes. Os corantes na concentração de 0,01% foram incubados com os compostos de baixa massa molar 1:1(v/v), durante 72 horas, no escuro, em temperatura ambiente. Os compostos de baixa massa molar de *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea*, sem alteração do pH, apresentaram descoloração do corante Azul brilhante H-GR, 24% e 21% respectivamente, com 21 dias de incubação. Os CBMM de ambos os fungos não apresentaram descoloração do corante Vermelho FN-2BL. Nas frações com o pH alcalinizado, os quelantes não conseguiram sequestrar íons férricos por causa de sua precipitação e não tiveram descoloração dos corantes reativos. Esses resultados sugerem que o mecanismo de descoloração proporcionado pelos compostos de baixa massa molar deve ser a reação de Fenton, tendo em vista a presença dos componentes a permitir essa reação nas frações, na descoloração em pH ácido e sua inibição em pH alcalino.

Palavras-chave: Corantes reativos; Quelantes de ferro; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Reação de Fenton; Descoloração.

ABSTRACT

Evaluation of potential discoloration of the reactive dyes used in textile industries by low molecular weight compounds produced by basidiomycetes

The degradation of textile dyes by basidiomycete fungi by their non-specific enzymatic complex, comprised mostly of extracellular enzymes and low molecular weight compounds, among iron chelator. This study aimed to evaluate the degrading capacity of low molecular weight compounds produced by iron reducer basidiomycetes, along with textile dyes Brilliant Blue H-RG and Red FN-2SB, and their behavior in alkaline conditions. *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727 and *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 were incubated in basal medium in the dark at 25° C for 21 days. At periods of seven and twenty-one days, triplicates were concentrated and ultrafiltered (5 kDa cutoff membranes) to obtain low molecular weight compounds at different physiological ages, which were divided into two lots, half of which had the pH changed to 9. These compounds were characterized by the production of iron chelators, Fe³⁺ reducing activity and the potential for decolorization of textile dyes. Alkalinization of low molecular weight compounds directly influenced the production of iron chelators and Fe³⁺ reducing activity by interfering in the quantification of these compounds. The dyes in 0,01 % concentration were incubated with low molecular weight compounds 1:1 (v/v) for 72 hours in the dark at room temperature. Low molecular weight compounds produced by *Trogia buccinalis* and *Peniophora cinerea*, with unaltered pH, showed decolorization of brilliant blue H-GR with 21 days of incubation (24 % and 21 %, respectively). Red dye FN-2BL wasn't decolorized for both fungi CBMM. In the fractions with alkaline pH, chelating agents were not able to sequester ferric ions due to their precipitation and showed no decolorization of the reactive dyes. These results suggest that the decolorization mechanism provided by low molecular weight compounds should be the Fenton reaction, since that the presence of these components permits this reaction in low molecular weight compounds, decolorization at acid pH and its inhibition at alkaline pH.

Keywords: Reactive dyes; iron chelator; *Peniophora cinerea*; *Trogia buccinalis*; Fenton reaction; decolorization.

INTRODUÇÃO

A contaminação de águas naturais vem sendo, sem dúvida, um dos grandes problemas da sociedade moderna. As indústrias têxteis têm uma enorme responsabilidade na contaminação hídrica, por gerar grandes volumes de efluentes, os quais causam sérios problemas ambientais, quando não corretamente tratados (SWAMY; RAMSAY, 1999).

O efluente da indústria têxtil mostra composição variada, dependendo do tipo de processo, do corante e dos tecidos utilizados, sendo caracterizado por intensa cor gerada pela grande quantidade de corantes não- fixados; pH alcalino; elevada temperatura; alta demanda química de oxigênio (DQO) e alta condutividade (GUGLIOTTA, 2001).

Os corantes são compostos caracterizados por apresentar baixa disponibilidade a biodegradação e resistência à destruição por métodos de tratamentos físico-químicos. A maioria dos corantes usados nas indústrias e seus metabólitos, após tratamento de efluentes, são recalcitrantes ao tratamento biológico, apresentando efeitos tóxicos, carcinogênicos ou mutagênicos (ZHAO; HARDIN, 2007).

As estruturas moleculares dos corantes Cibacron Azul brilhante H-GR e o corante reativo Vermelho FN-2BL não foram encontrados, pois seus fabricantes não divulgaram suas fórmulas moleculares. De acordo com Montano (2007) a sigla FN da Cibacron designa corantes reativos com dois ou mais grupos reativos. Em estudo posterior, caracterizou-se o corante reativo Vermelho FN-R, como hetero bireativo com grupos vinilsulfônico e fluortriazina (MONTANO, 2008).

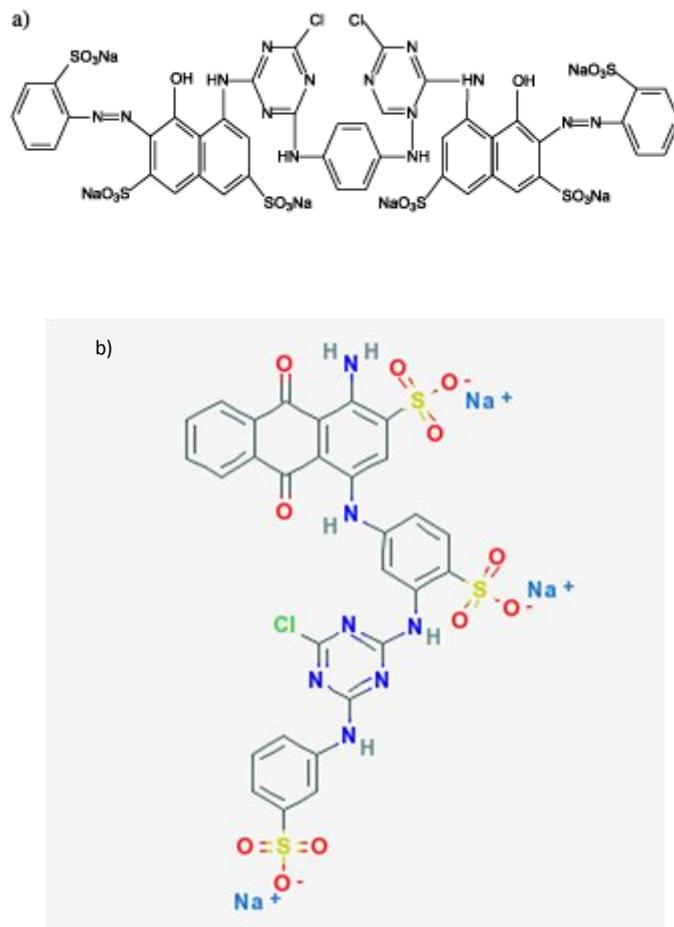


Figura 1 – Estrutura de corantes reativos: a) Procion red H-E7B (MONTANO, 2007) e b) Reativo Blue 5 (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary – 3/2011)

Há diversas formas de tratamento para os efluentes têxteis: físicos, químicos e biológicos. Contudo, sua utilização, isoladamente, não é eficiente, necessitando a combinação de técnicas complementares para se obter melhores resultados (MONTANO, 2007; KUNZ, 1999).

Pesquisas recentes apontam o potencial dos fungos basidiomicetos degradadores de lignina em degradar compostos recalcitrantes. Para a degradação da lignina é preciso um sistema ligninolítico de ação extracelular, oxidativo e não-específico como o dos fungos basidiomicetos de podridão branca. Esse processo multienzimático é resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoredutases, além de compostos intermediários de baixa massa molar. Esse sistema pode atuar na degradação de compostos xenobióticos, sendo capaz de mineralizar uma variedade de

poluentes resistentes à degradação e eficiente na descoloração de corantes, apresentando grande potencial de utilização em processos de biorremediação (GUGLIOTTA, 2001, KUNZ et al., 2002, MOREIRA-NETO et al., 2009).

Alguns espécimes de fungos basidiomicetos, nativos do Brasil, tiveram sua capacidade comprovada de degradar diversas moléculas de corantes. Fungos como *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, *Trametes villosa* e *Peniophora cinerea* conseguiram degradar o corante antraquinônico Azul Brilhante de Remazol (RBBR) (MACHADO et al., 2005b). *Trametes villosa* também degradou corantes reativos têxteis (MACHADO et al., 2006) e corante Índigo carmine (GUGLIOTTA 2001). Balan; Monteiro (2001) observaram a degradação do corante Índigo por *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pycnoporus sanguineus*.

Estudos sobre os compostos de baixa massa molar obtiveram considerável expressão nas últimas décadas, por explicarem como ocorre o início da degradação da madeira. Isso porque, apesar do conhecimento adquirido a respeito do papel das enzimas na biodegradação dos constituintes da madeira, sabe-se que o processo de biodegradação por fungos não pode ser explicado, unicamente, com base na ação das diversas enzimas lignocelulolíticas por eles secretadas (ARANTES; MILAGRES, 2007; AGUIAR et al. 2006; GOODELL et al., 1997). Considera-se que os compostos de baixa massa molar podem estar envolvidos com o início da degradação da madeira, penetrando na parede celular e funcionando em conjunto com os metais no começo da reação de despolimerização da parede celular da madeira. Dentre esses compostos, encontram-se os agentes quelantes de metais, oxalatos e peptídeos, capazes de complexar-se com Fe^{3+} e reduzi-lo a Fe^{2+} . Na presença de peróxido de hidrogênio, esses compostos desempenham papel degradativo, atacando a celulose e hemicelulose da madeira, por meio de radicais gerados pela reação do tipo Fenton (MILAGRES et al., 2002).

A atuação dos quelantes de ferro na degradação de lignina por fungos de degradação parda, utilizando o mecanismo tipo Fenton, é bem conhecida, mas um processo similar para fungos de degradação branca só foi elucidado para

Perenniporia medulla-panis (ARANTES, 2008). Estudos sobre a potencialidade de degradação de corantes têxteis e branqueamento da polpa de Kraft, os fungos basidiomicetos produtores de quelantes de ferro ofereceram os melhores resultados, destacando-se *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (MINUSSI et al., 2001) e *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (MILAGRES et al. 2002). Tais trabalhos levaram Milagres et al. (2002) a sugerir que a degradação desses compostos não está ligada apenas à atividade ligninolítica desses fungos, mas a presença de compostos de baixa massa molar (CBMM), os quais possuem quelantes de ferro.

A preocupação com o pH alcalino existe, pois grande parte dos estudos envolvendo a capacidade de descoloração de corantes têxteis, por fungos basidiomicetos, é realizada em meios com pH ideal para o crescimento dos mesmos, em torno de 4,5. Sendo o pH dos efluentes têxteis em torno de 10, há um enorme interesse estudar o desempenho dos fungos em valores de pHs alcalinos, a fim de identificar quais estarão mais aptos para posteriores utilizações na descoloração e, portanto, na descontaminação dos efluentes têxteis (CESCATO, 2006).

De maneira geral, os fungos são organismos cosmopolitas com alto poder de adaptação ao meio, podendo crescer em uma ampla faixa de pH, com capacidade de acidificar ou alcalinizar o meio para atingir seu valor de pH ótimo. Em culturas, os fungos, geralmente, mostram bom crescimento em pH entre 5 e 7, e as enzimas do sistema ligninolítico apresentam atividade entre 3,5 e 7. O pH afeta o crescimento, a produção e a atividade metabólica por sua atuação na permeabilidade celular e na disponibilidade de certos metais como magnésio, fósforo, ferro, cálcio e zinco. Desse modo, a meta do trabalho foi avaliar a capacidade degradativa dos CBMM produzidos por fungos basidiomicetos, redutores de ferro, junto dos corantes têxteis Azul brilhante H-GR e Vermelho FN-2BL e seu comportamento com a alcalinização do pH.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico: Utilizou-se as linhagens de fungos basidiomicetos de podridão branca *Peniophora cinerea* (Pers.) Cooke CCIBT 2541 e *Trogia buccinalis* (Mont.) Pat. CCIBT 2727, depositados na coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Brasil). As culturas foram mantidas, a 4 °C, em EMA (extrato malte ágar), constituído de extrato de malte 2%; peptona 0,1%; ágar 1,5%; glicose 2%.

Corantes sintéticos: Foram utilizados os corantes têxteis reativos Cibacron Azul Brilhante H-GR e Vermelho FN-2BL, fornecidos por Ciba-Geysse. Os corantes foram preparados na concentração de 2g/100mL com pH 10 e hidrolizados a 60 °C, por uma hora. Os picos máximos de absorção dos corantes obtiveram-se por varredura em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-VIS) no intervalo de comprimento de onda de 400-800 nm.

Condição de cultivo: Os fungos foram inoculados com seis discos de 5 mm de diâmetro, com crescimento micelial de sete dias de incubação, em frascos de erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio basal modificado (MACHADO et al., 2006) e incubados a 25 °C, no período de 21 dias. Durante esse período, em intervalos de 7 e 21 dias, lotes de nove frascos com inóculo de cada fungo foram retirados para a obtenção e caracterização dos compostos de baixa massa molar.

Obtenção dos compostos de baixa massa molar (< 5 KDa): Após filtragem dos cultivos, três réplicas de cada fungo foram misturadas, para aumentar o volume final dos compostos de baixa massa molar, totalizando em triplicatas para cada tratamento. Os extratos desses fungos (triplicata) foram liofilizados,

re-suspensos em água MilliQ a 10% do seu volume inicial e ultrafiltrados usando membranas de corte 5 kDa (marca VIVASPIN 15) a 3.950 rpm por 99 minutos (Centrífuga EPPENDORF – Mod. 5804 R).

Modificação do pH dos compostos de baixa massa molar nas diferentes idades fisiológicas: Metade dos lotes dos CBMM foram alcalinizados com NaOH 2N para o pH 9 e os demais empregados como controle das frações com o pH do meio.

Método CAS para detecção de atividade de quelante de Fe³⁺: Para a detecção da presença de compostos com atividade quelante de Fe³⁺, aplicou-se o método universal CAS (Cromo Azurol S) (SCHWYN; NEILAND, 1987), baseado na competição por ferro entre o complexo férrico do corante indicador CAS e do quelante produzido pelos fungos. Os testes foram realizados em triplicata.

Atividade redutora de Fe³⁺ : Para a determinação da atividade redutora de ferro aplicou-se o teste de ferrozina por espectrofotometria a 562 nm, em triplicata, conforme descrito por Stookey (1970), modificado por Aguiar (2008).

Descoloração *in vitro*: Solução de cada corante a 0,01% foi incubada nos CBMM 1:1 (v/v) (triplicata) por 72 horas, a 25 °C, no escuro. Como controle se usou a mistura de corante com meio de cultura sem inóculo 1:1 (v/v). A porcentagem de descoloração foi quantificada por espectrofotometria utilizando a absorbância do comprimento de onda característico de cada corante (530 nm corante Vermelho FN-2BL e 640 nm corante Azul Brillhante H-GR) de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ descoloração} = [100 - (Ac * 100)/Ab]$$

Onde: Ac= Absorbância no pico característico do corante

Ab= Absorbância do pico característico do corante no tempo 0 (zero)

Teste de degradação dos corantes: Avaliou-se pela da razão entre as leituras da absorvância em dois comprimentos de onda em espectrofotômetro, segundo o método proposto por Glenn & Gold (1983).

Análise estatística dos dados: Os dados foram analisados pelo programa estatístico Minitab 15 (2011). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando foi observado efeito significativo superior ou igual a 95% de probabilidade ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Em conformidade com Vieira e Hoffmann (1989) os dados percentuais foram transformados na expressão abaixo

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \sqrt{\text{valor em \%} / 100}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH alcalino é um dos fatores agravantes no emprego de fungos basidiomicetos no tratamento de efluentes. Em cultura, os fungos, geralmente, indicam bom crescimento em pH entre 5 e 7. O pH está associado, entre outros fatores, à disponibilidade de nutrientes na forma iônica e à solubilidade de íons metálicos, os quais podem ser altamente tóxicos aos fungos. As enzimas atuantes no sistema lignolítico demonstram um pH ótimo de atividade que, de maneira geral, situa-se entre 3,5 e 7 (MOREIRA-NETO, 2006).

Os compostos de baixa massa molar produzidos por *P. cinerea* e *T. buccinalis* foram alcalinizados com NaOH para pH próximo de 9, sendo que os CBMM sem alteração de pH foram utilizados como controle das análises. *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea* não apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando comparados em suas diferentes idades fisiológicas e comparados entre fungos para a mesma idade (Figura 2).

Pela análise de CAS, foi possível identificar que a alcalinização dos CBMM inibiu totalmente a capacidade de quelação dos íons de ferro presentes. Sylva (1972) defende que a concentração de ferro em pH alcalino é reduzida em virtude da formação e precipitação de hidróxidos ($Fe_x(OH)_y$). Quando avaliada a influência do choque de pH no meio de cultura, Melo (2009), observou a atividade CAS em torno de 48% para *T. buccinalis*, com 14 e 21 dias, e 70% para *P. cinerea* com 14 dias de incubação, após alteração de pH para em torno de 9. No mesmo estudo os dois fungos foram capazes de manter o pH ótimo, mesmo no momento do choque, com sete e 14 dias de incubação. Esses resultados indicam a importância do micélio fúngico para o equilíbrio das reações.

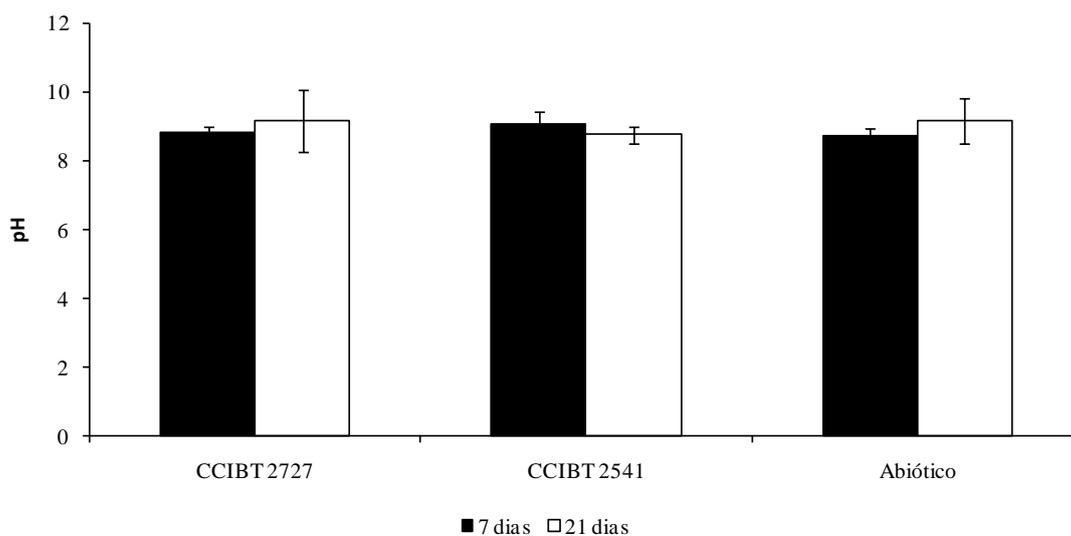


Figura 2 – pH alcalinizado dos compostos de baixa massa molar de *Trogia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541) em diferentes idades fisiológicas. Controle abiótico, meio sem inoculação. Barras de erro \pm desvio padrão da média

Contrário a influência do pH na quelação dos íons de ferro, a atividade redutora de Fe^{3+} apresentou uma alta taxa de redução de ferro, tanto para *T. buccinalis* (25 μM) quanto para *P. cinerea* (13 μM), ambos com 21 dias de cultivo (Figura 3). Arantes e colaboradores (2006) observaram produção máxima (0,4 μM) também com 21 dias de cultivo para *P. medulla-panis*, em meio com carência de ferro. O comportamento da atividade redutora de ferro foi similar aos descritos na literatura, com aumento gradual de redução de ferro durante o cultivo (ARANTES, 2008; AGUIAR et al., 2006, 2007).

Esses resultados foram superiores aos obtidos nas frações sem alteração de pH. Diferentes fatores podem ter alterado os resultados nesse ensaio:

- O NaOH adicionado aos compostos de baixa massa molar pode ter interferido na quantificação da atividade redutora de ferro, aumentando a afinidade da ferrozina com o Fe^{2+} disponível, resultando em uma maior quantificação, ou

- pelo fato da reação de Fenton não ocorrer em pH alcalinos (ARANTES; MILAGRES, 2009; MONTANO, 2007; NOGUEIRA et al., 2007; SOUZA; ZAMORA, 2005; SYLVA, 1972), foi possível analisar a

real quantidade de Fe^{2+} produzido, já que esse não reage com peróxido de hidrogênio em pHs básicos.

Essa suposição é sustentada visto que antes da alcalinização do meio, os quelantes já se encontravam complexados com Fe^{3+} , que permitiu sua redução para Fe^{2+} . Arantes e colaboradores (2006) tiveram conclusões semelhantes com quelantes sintéticos em intervalo de pH de 2 a 7.

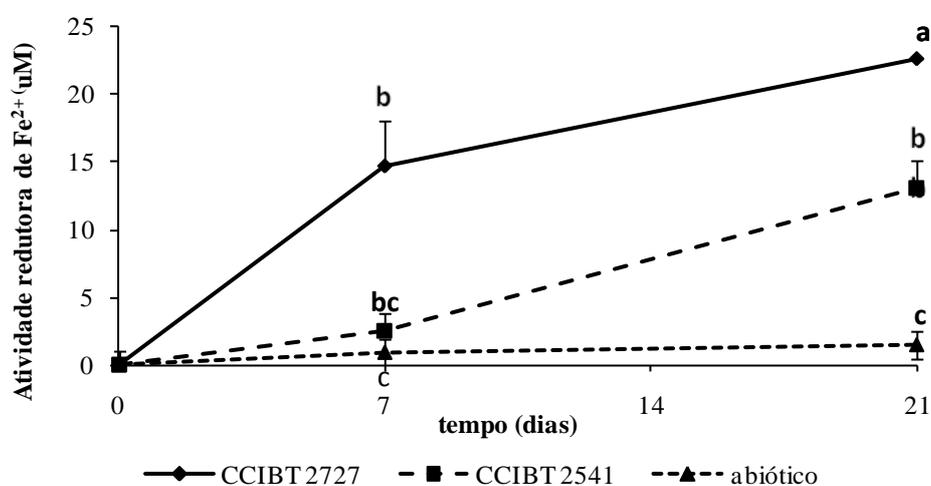


Figura 3 – Atividade redutora de Fe^{3+} dos compostos de baixa massa molar produzidos por *Trogia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea*. Mesmas letras indicam igualdade estatística - (Teste Tukey $P \leq 0,05$). Barras de erro \pm desvio padrão da média

Degradação biológica dos corantes reativos utilizados nas indústrias têxteis

Os ensaios de descoloração dos corantes pelos CBMM de *T. buccinalis* e *P. cinerea* (com e sem alcalinização de pH), produtores de quelantes de ferro, do tipo catecol foram realizados no início e no final do cultivo, sendo monitorada a reação de descoloração por 72 horas.

A reação de descoloração do corante reativo Azul brilhante H-GR (0,01%) pelos CBMM de *T. buccinalis* e *P. cinerea* diferiu em cada idade fisiológica

(Figuras 4-A e B). Apenas os CBMM produzidos com 21 dias de incubação indicaram descoloração significativa do corante, e a maior porcentagem de descoloração foi de 38%. A variação da descoloração para cada fungo, nas 72 horas não foi significativa ($P \leq 0,05$) com exceção no tempo de 72 horas para *T. buccinalis*.

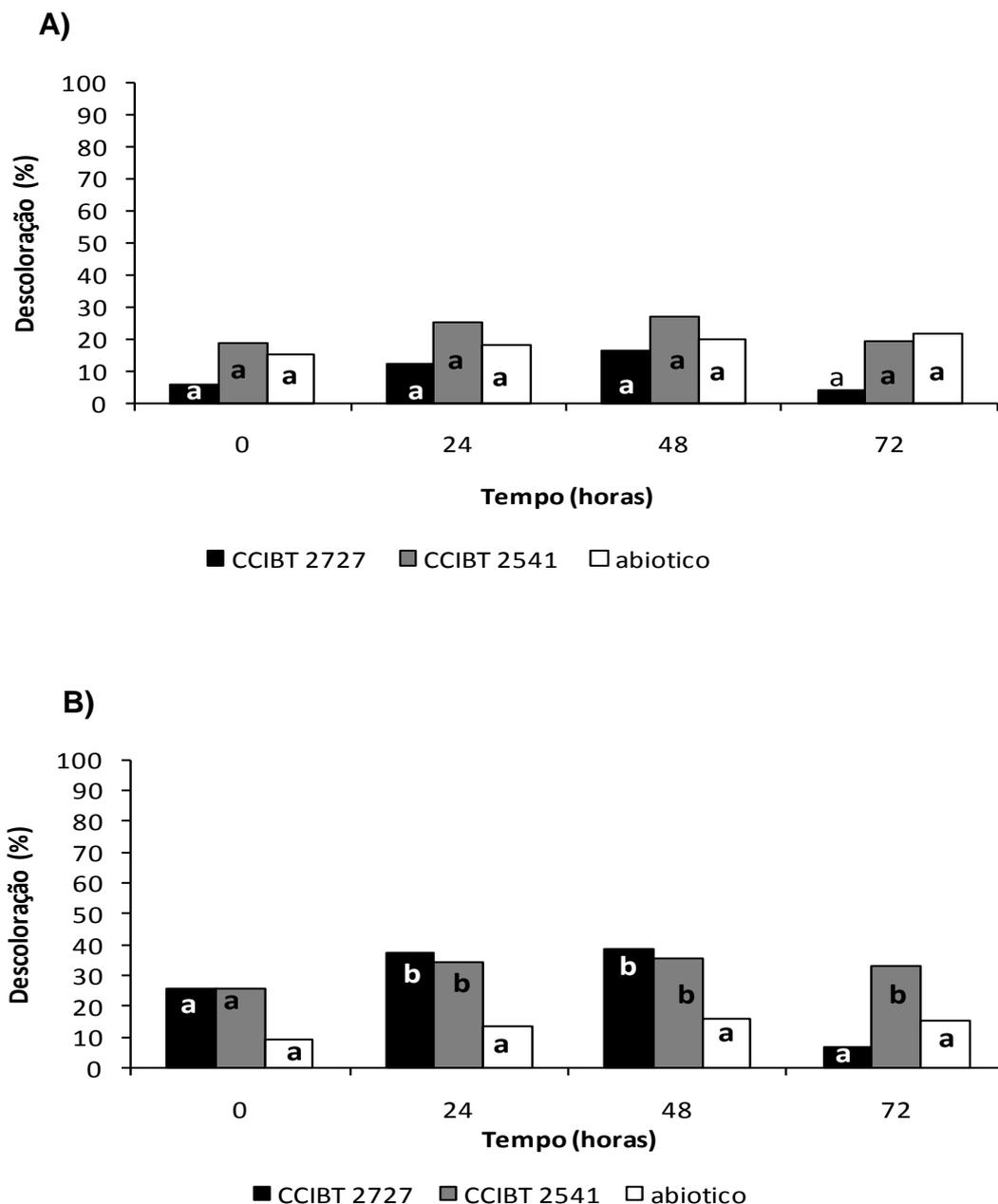


Figura 4. – Monitoramento da descoloração do corante Azul brilhante H-GR (0,01%) pelos compostos de baixa massa molar produzidos em diferentes idades fisiológicas por *Trogia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541), durante 72 horas de reação. Controle abiótico, meio sem inoculação A) Sete dias de incubação e B) 21 dias de incubação. Mesmas letras indicam igualdade estatística - (Teste Tukey $P \leq 0,05$)

Com 21 dias de incubação percebeu-se que a descoloração iniciou no tempo zero da reação do corante com os CBMM, e estabilizou entre 24 e 48 horas, com alteração a partir de 72 horas, indicando instabilidade da reação, principalmente, para *T.buccinalis*. Uma hipótese para esse comportamento seria a ciclagem entre Fe^{2+} e Fe^{3+} na reação de Fenton. Esta reação é dividida em duas fases. Na primeira, Fe^{2+} inicia a decomposição de H_2O_2 em uma reação muito rápida ($k_1 = 63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) resultando na geração de $\bullet\text{OH}$. Depois de a maior parte de Fe^{2+} ser oxidada a Fe^{3+} , a segunda fase se torna predominante, envolvendo uma sequência de reações de propagação entre Fe^{3+} e H_2O_2 ou $\text{HO}_2\bullet$, as quais formam um ciclo que se mantém pela regeneração de Fe^{2+} . Contrário à primeira fase, a segunda fase é muito mais lenta, representada, principalmente, pela baixa constante de velocidade ($k_2 = 0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (KANG et al., 2002).

Esses resultados também foram analisados pelo método de Glenn e Gold (1983), com o objetivo de confirmar a instabilidade da molécula. De acordo com os autores, a degradação de corantes pode ser monitorada durante o cultivo do fungo em meio líquido, pela razão entre dois comprimentos de onda, sendo um deles o pico característico do corante. Quando as razões se mostram constantes ao longo do tempo, caracteriza-se a adsorção do corante pelo micélio fúngico e quando a razão for decrescente, pode-se inferir que houve degradação.

Contudo, no presente trabalho não há presença de micélio no meio reacional, composto apenas pelo corante e os CBMM. Os resultados obtidos nesta análise foram utilizados para demonstrar a estabilidade da reação, corroborando com a hipótese da participação dos CBMM na descoloração da molécula, pela reação de Fenton. A reação ocorre no tempo zero, estabiliza-se nas primeiras 48 horas, e possivelmente, com 72 horas inicia a ciclagem entre Fe^{2+} e Fe^{3+} (Figura 5). A instabilidade da reação demonstra a importância da presença do micélio fúngico com seu complexo enzimático extracelular para a estabilização da descoloração.

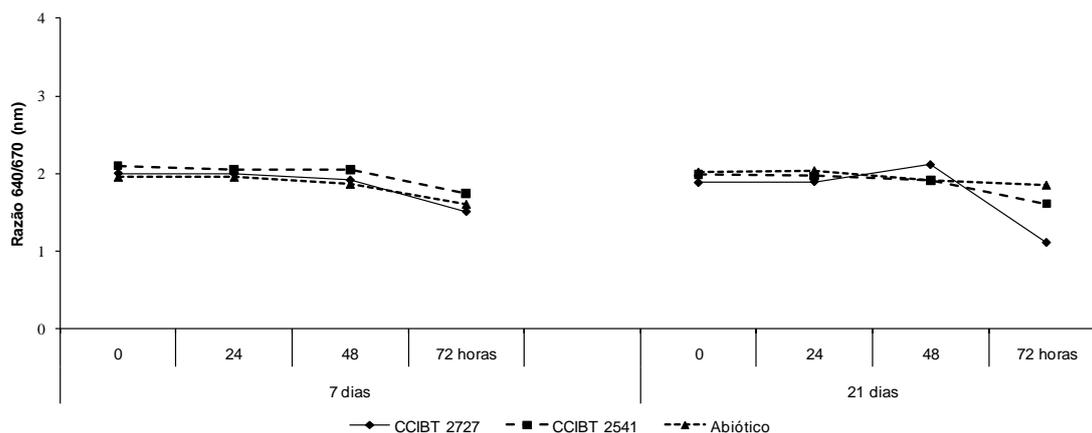


Figura 5 – Variação da razão das absorvâncias do corante reativo Azul brilhante H-GR com os CBMM produzidos em diferentes idades fisiológicas produzidos por *Troglia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541), durante 72 horas de reação, nos comprimentos de onda de 640 e 670 nm. Controle abiótico, meio sem inoculo

O corante reativo Vermelho FN-2BL, na mesma concentração 0,01% não foi observada descoloração significativa dos CBMM ($P \leq 0,05$) (Figura 6).

A capacidade de descolorir o corante reativo Azul brilhante H-GR e não o corante reativo Vermelho FN-2BL foi constatada em vários trabalhos do grupo (MELO, 2009; PARANHOS, 2007). Uma possibilidade para essa diferença seria a distinta estrutura molecular de cada corante. O corante Azul brilhante H-GR, possivelmente, possui o grupo cromóforo derivado de antraceno, enquanto o corante Vermelho FN-2BL deve ser do tipo azo. Outra explicação provável para a diferença é o modo no qual os fungos aqui estudados foram selecionados. Esses fungos foram inicialmente selecionado por sua capacidade em descolorir o corante Azul brilhante remazol-R (RBBR), derivado de antraceno, em pHs entre 5 a 9 (MOREIRA-NETO et al., 2011), dessa forma selecionaram os basidiomicetos mais aptos em degradar estruturas semelhantes a do corante modelo do que as do corante azo.

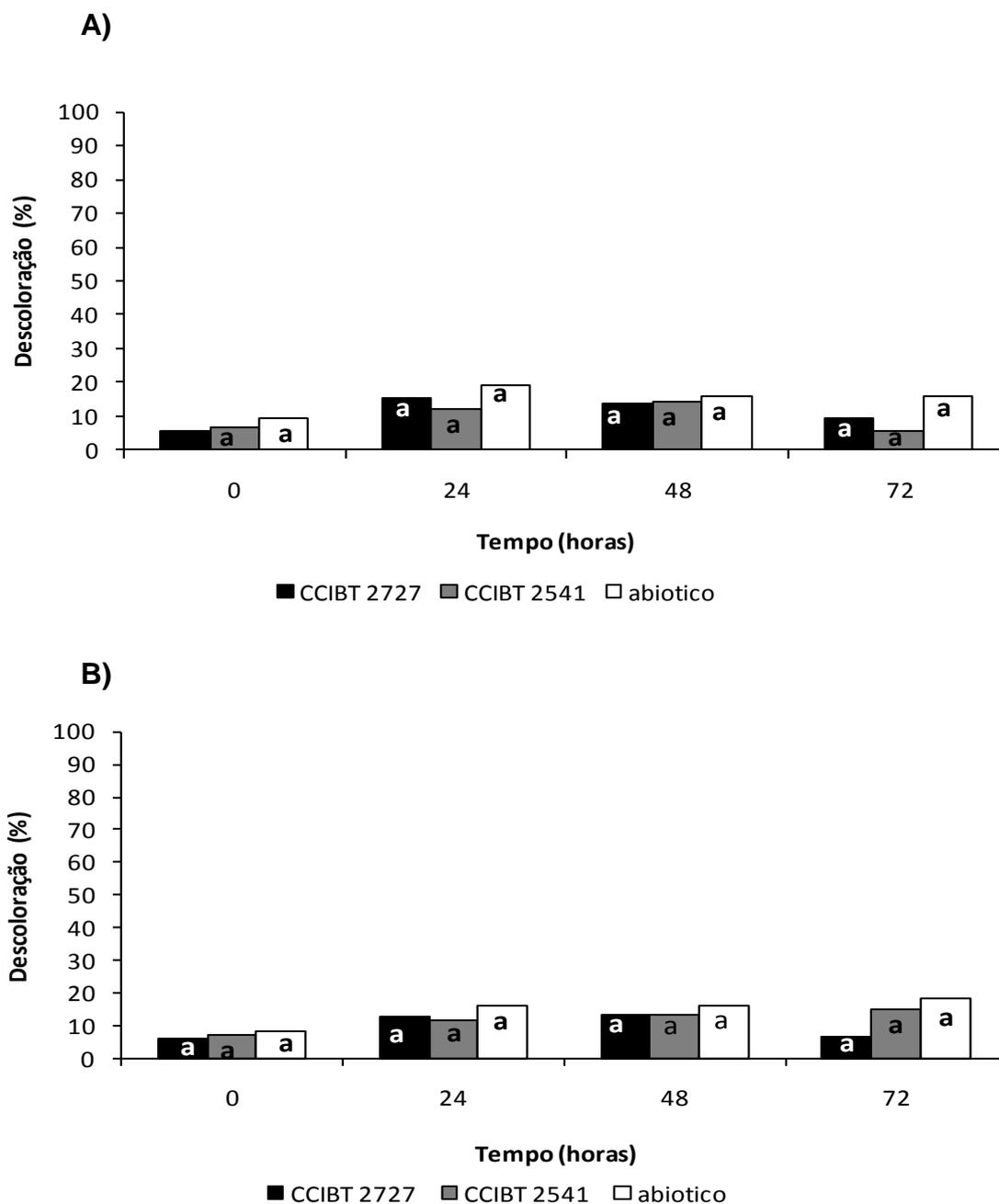


Figura 6 – Monitoramento da descoloração do corante azo reativo Cibacron Vermelho FN-2BL (0,01%) pelos compostos de baixa massa molar produzidos em diferentes idades fisiológicas por *Trogia buccinalis* (CCIBT 2727) e *Peniophora cinerea* (CCIBT 2541), durante 72 horas de reação. Controle abiótico, meio sem inoculação. A) Sete dias de incubação e B) 21 dias de incubação. Letras semelhantes indicam igualdade estatística - (Teste Tukey $P \leq 0,05$)

Arantes e colaboradores (2006) comprovaram a capacidade de quelantes de ferro reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} e esse deve agir com peróxido de hidrogênio formando radicais hidroxilas pela reação de Fenton, capazes de degradar a molécula do corante polimérico Poly R-478. Nesse mesmo estudo utilizando vários tipos de quelantes sintéticos obtiveram maior eficiência na redução de Fe^{3+} pelos quelantes tipo catecol -3,4 ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e 2,3-ácido diidroxibenzoico (DHBA) com redução em uma ampla faixa de pH (2-7).

Os radicais hidroxilas se caracterizam por seu poder oxidante não-seletivo, que pode reagir com a molécula do corante rompendo as duplas ligações formando moléculas menores ou retirando um átomo de hidrogênio, descolorindo assim o corante. Essa reação pode ocorrer por três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons ou adição radicalar gerando radicais secundários capazes de reagir com outros compostos, como por exemplo, os radicais catiônicos formados pelas enzimas ligninolíticas (KUNZ et al., 2002) (Figura 7).

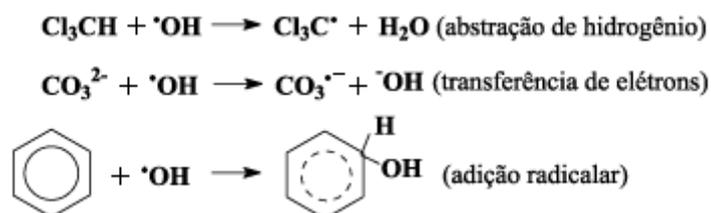


Figura 7– Reações iniciadas por radical hidroxila

Fonte: KUNZ et al., 2002

Estudos mostram que o primeiro ataque dos $\text{HO}\cdot$ é em uma região rica em elétrons da molécula, próximo aos átomos de N do grupo azo ou do grupo amino. Montano e colaboradores (2008b), notaram a ação degradativa do $\text{HO}\cdot$ estudando a degradação de Procion vermelho H-E7B por processo de foto-Fenton. Esse estudo obteve descoloração total do corante e sugere que a sequência de oxidação provocada pelo $\text{HO}\cdot$ ocorre, preferencialmente, no cromóforo central da molécula do corante quebrando-a em três partes, na qual

duas substituem o anel naftaleno e uma o anel central. Após o tratamento não detectou-se compostos intermediários de corantes azos reativos.

Para degradar o corante azo reativo Cibacron Vermelho FN-R, os autores propõem combinação de processos biológico e químico. Na primeira etapa a degradação é promovida anaerobiamente, visto que não foi possível a degradação aerobiamente. Houve pouca remoção da cor e os autores acreditam ter formado aminas aromáticas originadas da quebra do anel azo, tornando o efluente mais tóxico que o original. Como pós-tratamento químico, avaliou os processos foto-Fenton e ozônio para a degradação dos subprodutos. A melhor taxa de mineralização foi obtida com aplicação de ozônio (83%). Para foto-Fenton, as condições não foram suficientes para uma oxidação completa (MONTANO, 2007).

A descoloração de corantes têxteis por fungos basidiomicetos por seu complexo enzimático extracelular já é bem conhecido pela literatura. Gugliotta (2001) conseguiu descoloração do corante indigo em torno de 90%, redução da toxicidade e os subprodutos não mostraram mutagenicidade quando tratados com *Trametes villosa* e *Hygrocybe* sp.

Batthi e colaboradores (2008) alcançaram um aumento na porcentagem de descoloração do corante azo reativo Vermelho FN-2BL por *Schizophyllum commune*, quando usou como fontes de carbono a glicose e de nitrogênio a uréia passando de 60% a 90% de descoloração em pH ácido (pH 4,5) e temperatura a 30°C. *P.cinerea* teve melhores porcentagens de descoloração, em torno de 94% para o corante Azul brilhante remazol R e 80% para o corante azo reativo Vermelho FN-2BL, quando a sacarose foi aplicada como fonte de carbono em meio basal (OLIVEIRA et al., 2010).

A capacidade dos CBMM, com 21 dias de incubação, em descolorir o corante reativo Azul Brilhante H-GR foi comprovada nesse estudo, mas a aplicabilidade desses compostos em tratamento de efluentes só é possível com a presença do micélio para estabilizar sua reação dando prosseguimento a degradação por meio do complexo enzimático.

Estudos de descoloração *in vivo* dos mesmos corantes aqui estudados, por *P.cinerea* em diferentes idades fisiológicas, a maior porcentagem de descoloração obtida foi nos primeiros dias de incubação, cinco e sete dias, com 82% e 74%, respectivamente, para o corante Azul brilhante H-GR e 30% e 31%, para o corante Vermelho FN-2BL. Ao avaliar a descoloração com 14 dias de incubação as porcentagens se repetiram (KFOURI e VITALI 2010, dados não-publicados), podendo ser uma evidência da atuação dos CBMM na degradação, posto que seu pico de atividade de fenoloxidase se dá com 25 dias de incubação (PARANHOS, 2007).

No presente trabalho foi possível observar que para ambos os fungos a maior redução de Fe^{3+} conseguiu-se no meio com maior produção de quelantes tipo catecol, considerando que esse tipo de quelante é o principal responsável pela atividade de redução do Fe^{3+} (ARANTES; MILAGRES, 2006a).

Quando avaliou-se a descoloração no meio reacional com pH alcalino, em torno de 9, observou-se que não ocorreu a quelação do Fe^{3+} (% CAS), resultado já relatado na literatura (ARANTES, 2008; GOODELL et al., 1997; MACHUCA, 1995).

Os CBMM com pH alcalino não apresentaram descoloração de ambos os corantes, o que indica a hipótese da reação de Fenton ser o mecanismo utilizado pelos CBMM na degradação dos corantes, já que esta não ocorre em meio com pH alcalino (ARANTES, 2008; MACHUCA, 1995).

A partir desses resultados, verificou-se que as reações de Fenton com compostos de baixa massa molar redutores de Fe^{3+} produzidos por *T. buccinalis* e *P. cinerea*, são capazes de degradar o corante reativo Azul Brilhante H-GR, com idade fisiológica de 21 dias. Pode-se deduzir que os CBMM desempenham papel importante na degradação de poluentes orgânicos recalcitrantes contribuindo com o aparato enzimático de cada grupo, visto que todos os basidiomicetos de podridão branca selecionados para degradar compostos organoclorados produziam quelantes de ferro (BONFIM; VITALI, dados não-publicados).

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que os compostos de baixa massa molar, produzidos por *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea* foram capazes de descolorir apenas o corante reativo Azul brilhante H-GR.

Acredita-se que a via de degradação empregada por esses fungos na descoloração do corante reativo foi a reação de Fenton, uma vez que esta reação não ocorre em pH alcalino e não foi detectada descoloração pelos compostos de baixa massa molar com pH alcalinizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, A. M. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota***. 2008. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

AGUIAR, A., SOUZA-CRUZ, P. B., FERRAZ, A.. Oxalic acid, Fe³⁺-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from Pinus taeda wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme and microbial technology**, n. 38, p. 873-878, 2006.

ARANTES, V.; QIAN, Y.; MILAGRES, A. M. F.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by a biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: Implications for brown rot decay. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 478-483, 2009.

ARANTES, V. **Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**. 2008. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 273–279, 2007a.

ARANTES, V.; BALDOCHI, C.; MILAGRES, A. M. F. Degradation and decolorization of a biodegradable-resistant polymeric dye by chelator-mediated Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 63, p. 1764–1772, 2006.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 887-891, 2006a.

BALAN, D. S.; MONTEIRO, R. T. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal Biotechnology**, n. 89, v. 2-3, p. 141-145, 2001.

CESCATO, F.. **Seleção de basidiomicetos capazes de descolorir o corante Azul Brillhante de Remazol R em valores de pH alcalino**. Santos: Universidade Católica de Santos, 2006.

GLENN, J. K.; GOLD, M. Hx.. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 45, p. 1741-1747, 2002.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of biotechnology**, n. 53, p. 133-162, 1997.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil**. 2001. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

KANG, N., LEE, D. S., YOON, J. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. **Chemosphere**, n. 47, p. 915–924, 2002..

KUNZ, A. **Remediação de efluente têxtil: combinação entre processo químico (ozônio) e biológico (*P. chrysosporium*)**. 1999. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

KUNZ, A., PERALTA-ZAMORA, P., MORAES, S. G.; DURÁN, D.. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, n. 25, p. 78-, 2002.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 468-473, 2006.

MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 246-252, 2005b.

MACHADO, K. M. G. ; COMPART, L. C. A. ; MORAIS, R. O. ; ROSA, L. H. ; SANTOS, M. H. . Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous

fungi from brazilian ecosystem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.

MACHUCA, A. E. H. **Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular, com atividade fenoloxidásica, de *Thermoascus aurantiacus***. 1995. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

MELO, J. P. **Avaliação da degradação de corantes têxteis reativos da indústria têxtil por quelantes de ferro produzidos por fungos basidiomicetos**. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2009.

MILAGRES, A. M. F., ARANTES, V., MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by White and Brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 30, p. 562-565, 2002.

MINUSSI, R. C., MORAES, S. G., PASTORE, G. M.; DURAN, N.. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in applied Microbiology**, n. 33, p. 21-25, 2001.

MONTANO, J. G.; TORRADES, F.; PEREZ-ESTRADA, L. A. P.; OLLER, I. MALATO, S.; MALDONADO, M. I.; PERAL, J. Degradation pathways of the commercial reactive azo dye Procion Red H-E7B under solar-assisted photo-Fenton reaction. **Environ Sci Technol.**, v. 42(17), p. 6663-70, 2008.

MONTANO, J. G. **Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for commercial reactive azo dyes removal**. 2007. 262 f. Tese (Doutorado em química). Universidade de Barcelona, Bellaterra, 2007.

MOREIRA- NETO, S. L. et al. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Submetido. 2011.

MOREIRA-NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical

basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1075-1082, 2009.

MOREIRA- NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por Psilocybe castanella CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e Foto- Fenton. **Química nova**, v. 30, p. 400-408, 2007.

OLIVEIRA, L. H. S.; BARRETO, M. B; VITALI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, v.33, p. 85-99, 2010.

PARANHOS, A. P. S. **Avaliação da produção de quelantes de ferro por fungos basidiomicetos e degradação de corantes da indústria têxtil**. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2007.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160. In: Milagres, A. M.F., Machuca, A., Napoleão. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, n. 37, p. 1-6, 1987.

SOUZA, C.R.L.; PERALTA-ZAMORA P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/ peróxido de hidrogênio. **Química nova**, v. 28, n. 2, p. 226-228, 2005.

STOOKEY, L. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 781- 783, 1970.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and microbial technology**, n. 24, p. 130 -137, 1999.

SYLVA, R. N. The hydrolysis of iron(III). **Review of Pure and Applied Chemistry**, n. 22, p. 115–130, 1972.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

ZHAO, X.; .HARDIN, I. R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, n. 73, p. 322- 325, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir:

- Os compostos de baixa massa molar de *Trogia buccinalis* e *Peniophora cinerea* são capazes de descolorir o corante reativo têxtil Azul brilhante H-GR, corroborando com o processo de degradação desses fungos
- A predominância de quelantes de Fe^{3+} tipo catecol produzido por esses fungos sugerem sua capacidade de degradar compostos recalcitrantes, por sua maior eficiência na redução e liberação do ferro no ambiente.
- Acredita-se que, neste trabalho, a atividade redutora do Fe^{3+} dos quelantes de *T. buccinalis* e *P. cinerea* foi subestimada com base nas porcentagens de descoloração dos corantes reativos pelos compostos de baixa massa molar desses fungos.
- A redução de Fe^{3+} , no meio reacional alcalino, sugerem que os quelantes já complexados com Fe^{3+} não sofreram inibição para a redução quando o meio foi alcalinizado.
- A reação de Fenton é o mecanismo de degradação mais indicado para explicar a descoloração dos corantes têxteis, pelos compostos de baixa massa molar, produzidos por esses fungos, visto a presença dos componentes a permitirem essa reação nesses compostos, a descoloração em pH ácido e sua inibição em pH alcalino.
- A produção de quelantes tipo catecol redutores de ferro é uma característica importante a ser considerada em relação de basidiomicetos lignolíticos, para estudo de potencialidade de degradação de compostos recalcitrantes, por proporcionar desestabilização da molécula otimizando a ação das enzimas lignolíticas
- Como perspectiva, o tratamento de efluentes têxteis pelos compostos de baixa massa molar é um processo que necessita de mais estudos, tendo em vista que o pH alcalino desses efluentes é um limitante para o mecanismo de degradação estudado neste trabalho. Contudo, acredita-se que na presença do micélio fúngico os CBMM conseguem atuar aumentando a capacidade de degradação dos compostos recalcitrantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ABRAHÃO, J. A.; SILVA, G. A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, v. 67, p.8-34, 2002.

AGUIAR, A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2008, 121f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Fe³⁺ and Cu²⁺-reduction by fenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reaction. **Chemosphere**, v.66, p. 947-954, 2007.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺ -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and microbial technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, 869 p.

ANDER, P.; STOYTSCHEV, I.; ERIKSSON, K. E. Cleavage and metabolism of methoxyl groups from vanillic and ferulic acids by brown-rot and soft-rot fungi. **Cellulose Chemical Technology**, v. 22, p. 255-266, 1988.

ARANTES, V. et al. Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: Implications for brown-rot decay. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 478-483, 2009.

ARANTES, V. 2008. **Caracterização de compostos de baixa massa molar redutores de ferro produzidos por fungos e mediação da reação de Fenton para degradação de polissacarídeos e lignina**. 2008, 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 273–279, 2007a.

ARANTES, V.; BALDOCHI, C.; MILAGRES, A. M. F. Degradation and decolorization of a biodegradable-resistant polymeric dye by chelator-mediated Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 63, p. 1764–1772, 2006.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 887-891, 2006a.

ARNOW, L. E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 188, p. 531-537, 1937.

AUST, S. D. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbial Ecology**, v. 20, p. 197-209, 1990.

BALAN, D. S.; MONTEIRO, R. T. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n.2, p. 215- 242, 2006.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: “Uma resposta dos microrganismos”. **Química nova**, v. 25, n.6b, p. 1155 -1164. 2002.

BLANCHETTE, R. A. et al. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, 203–213, 1997.

BOER, C. G., OBICI, L., DE SOUZA, C. G., AND PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Biores. Technol.** v. 94. p. 107–112, 2004.

CAMMAROTA, M. C.; COELHO, M. A. Z. Tratamento enzimático para remoção de cor de efluentes da indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, v. 65, p. 40-47, 2001.

CATANHO, M.; MALPASS, G. R. P.; MOTHEO, A. J. Avaliação dos tratamentos eletroquímicos e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química nova**, v. 29, n. 5, p. 938-989, 2006.

CESCATO, F. **Seleção de basidiomicetos capazes de descolorir o corante Azul Brilhante de Remazol R em valores de pH alcalino.** Monografia (graduação), Universidade Católica de Santos, Santos. 2006.

CETESB. **Guia técnico ambiental da indústria têxtil.** São Paulo. 2009

CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; JELLISON, J.; FEKETE, F. A. Oxidation of 2-keto- 4-thiomethylbutyric acid (KTBA) by iron-binding compounds produced by the wood decaying fungus *Gloeophyllum trabeum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 90, p. 263- 266, 1992.

CHEN, F.; MA, W. H.; HE, J. J.; ZHAO, J. C. Fenton degradation of malachite green catalyzed by aromatic additives. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, p. 9485- 9490, 2002a.

COHEN, R.; JENSEN, K. A.; HOUTMAN, C. J.; HAMMEL, K. E. Significant levels of extracellular reactive oxygen species produced by brown rot basidiomycetes on cellulose. **FEBS Letters**, v. 531, p. 483-488, 2002.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Differential stress-induced regulation of two quinone reductases in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 324–331, 2004.

CSÁKY, T. Z. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 2, p. 450-454, 1948.

EERD, L. L. V.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganism. **Weed Science**, v. 51, p. 472- 495, 2003.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; ITAKURA, S. Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. In: GOODELL, B.; NICHOLAS, D. D.; SCHULTZ, T. P. **Wood deterioration and preservation – Advances in our changing world**. Washington: American Chemical Society, p. 140-153. ACS Symp. Ser 845, 2003.

ENOKI, A.; ITAJURA, S.; TANAKA, H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 265-272, 1997.

ENOKI, A., HIRANO, T., TANAKA, H. Extracellular substance from the Brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. **Material and Organisms**, v. 27, p. 247-261, 1992.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. **Wood Science and Technology**, v. 23, p. 1–12, 1989.

ENOKI, A.; TANAKA, H.; FUSE, G. Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by white-rot and brown-rot fungi. **Holzforchung**, v. 42, p. 85–93, 1988.

EVANS, C. S.; HEDGER, J. N. Degradation of plant cell wall polymers. In: GADD, G. M. (Ed.). **Fungi in bioremediation**. Cambridge: University Press, British Mycological Society, 2001. p. 1-24.

FEKETE, F. A.; CHANDHOKE, V.; JELLISON, J. Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2720–2722, 1989.

FERRAZ, A.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified “palo podrido” wood samples. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 203-208, 2001.

FILLEY, T. R.; HATCHER, P. G.; SHORTLE, W. C.; PRASEUTH, R. T. The application of ¹³C-labeled tetramethylammonium hydroxide (¹³C-TMAH) thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 181–198, 2000.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish peroxidase (HRP)**. 2006. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GALHAUP, C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.

GLENN, J. K.; GOLD, M. Hx.. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 45, p. 1741-1747, 2002.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin- Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GOODELL, B.; JELLISON, J.; LUI, J., DANIEL; G., PASZCZYNSKI, A.; FEKETE, F.; KRISHNAMURTHY, S.; JUN, L.; XU, G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of biotechnology**, v. 53, p. 133-162, 1997.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas – Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

HALLIWELL, G. Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. **Biochemical Journal**, v. 95, 35-40, 1965.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN JR., K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445-453, 2002.

HIGHLEY, T. L.; DASHEK, W. V. Biotechnology in the study of brown- and white-rot decay. In: Bruce, A.; Palfreyman, J. W. (Eds). **Forest products biotechnology**. Londres: Taylor & Francis, 1998. p. 15-36.

HIGHLEY, T. L. Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. **Material und Organismen**, v. 12, p. 25-36, 1977.

HIRANO, T.; ENOKI, A.; TANAKA, H. Immunogold labeling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown-rot fungus *Tyromyces palustris*. **Journal of Wood Science**, v. 46, p. 45-51, 2000.

HIRANO, T., TANAKA, H., ENOKI, A. Extracellular substance from the Brown-rot basidiomycete **Tyromyces palustris** that reduces molecular oxygen to hydroxyl radicals and ferric ion to ferrous ion. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 41, p. 334-341, 1995.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, p. 454-466, 2000.

HUNGER, K., JUNG, R. On the Toxicology and Ecology of Organic Colorants. **Chimia Internacional Journal for Chemistry**, v. 45, p. 297-300, 1991.

HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 201-221, 2006.

JELLISON, J.; GOODELL, B.; QIAN, Y. Methods useful in assessing biological and chemical activity of low-molecular-weight brown rot fungal metabolites. In: HURST, C. J. et al. (Eds). **Manual of environmental microbiology**, 3rd. Washington: ASM Press, 2007.

JELLISON, J.; CHEN, Y.; FEKETE, F. A. Hyphal sheath and iron-binding compound formation in liquid cultures of wood decay fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Postia placenta*. **Holzforschung**, v. 51, p. 503-510, 1997.

JELLISON, J.; CHANDHOKE, V.; GOODELL, B.; FEKETE, F. A. The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 805-809, 1991.

JENSEN JR., et al. Quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, p. 2699-2703, 2002.

JENSEN, K. A.; HOUTMAN, C. J.; RYAN, Z. C.; HAMMEL, K. E. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, p. 2705-2711, 2001.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluentes têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KANG, N., LEE, D. S., YOON, J. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. **Chemosphere**, n. 47, p. 915–924, 2002..

KANG, N.; LEE, D. S.; YOON, J. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. **Chemosphere**, v. 47, p. 915-924, 2002.

KEREM, Z.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, p. 49-54, 1999.

KEREM, Z.; BAO, W.; HAMMEL, K. E. Rapid polyether cleavage via extracellular one-electron oxidation by a brown-rot basidiomycete. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 10373-10377, 1998.

KIM, D.; DUCKWORTH, O. W.; STRATHMANN, T. J. Hydroxamate siderophore-promoted reactions between iron(II) and nitroaromatic groundwater contaminants. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, p.1297-1311, 2009.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W. & STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed., CABI Publishing, Wallingford, 2008. pp. 1-771.

KIRK, T. K. et al. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

KIRK, T. K.; IBACH, M. D.; MOZUCH, A. H. C.; HIGHLEY, T. L. Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. **Holzforschung**, v. 45, 239–244, 1991.

KIRK, T. K., SCHULTZ, E., CONNORS, W. J., LORENZ, L. F. & ZEIKUS, J. G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

KOENIGS, J. W. Hydrogen peroxide and iron: A microbial cellulolytic system? **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v, 5, p. 151-159, 1975.

KOENIGS, J. W. Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown rot basidiomycetes. **Wood and Fibre**, v. 6, p. 66-79, 1974a.

KOENIGS, J. W. Production of hydrogen peroxide by woodrotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. **Archives of Microbiology**, v. 99, p. 129-145, 1974b.

KOENIGS, J. W. KOENIGS, Effects of hydrogen peroxide on cellulose and on its susceptibility to cellulose. **Material und Organismen**, v. 7, p. 133–147, 1972a.

KOENIGS, J. W. Koenigs, Production of extracellular hydrogen peroxide by wood rotting fungi. **Phytopathology**, v. 62, p. 100–110, 1972b.

KOSMAN, D. J. MicroReview: Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1185-1197, 2003.

KRAMER, C.; KREISEL, G.; FAHR, K.; KASSBOHRER, J.; SCHLOSSER, D. Degradation of 2-fluorophenol by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*: evidence for the involvement of extracellular Fenton chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 387-395, 2004.

KIMURA, I. Y., GONÇALVES, A. C. STOLBERG, J. LARANJEIRA, M. C. M. FÁVERE, V. T. 1999. **Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana**. Artigo técnico científico. Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC.

KUNZ, A. **Remediação de efluente têxtil: combinação entre processo químico (ozônio) e biológico (*P. chrysosporium*)**. 1999. 104 f. Tese

(Doutorado em química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

KUNZ, A., PERALTA-ZAMORA, P., MORAES, S. G.; DURÁN, D.. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, n. 25, p. 78-, 2002.

MACHADO, K. M. G ; MATHEUS, D. R. Biodegradation of Remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473. 2006.

MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 246-252, 2005b.

MACHADO, K. M. G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados por resíduos industriais**. 1998. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MACHUCA, A.; PEREIRA, G.; AGUIAR, A.; MILAGRES, A. M. F. Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 7–12, 2007.

MACHUCA, A. E. H. **Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular, com atividade fenoxidásica, de *Thermoascus aurantiacus***. 1995. 162 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

MARTÍNEZ, A. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, p. 42-444, 2002.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (Ed.).

Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente, 1998. 184p.

MELO, J. P. **Avaliação da degradação de corantes têxteis reativos da indústria têxtil por quelantes de ferro produzidos por fungos basidiomicetos.** São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2009.

MILAGRES, A. M. F., ARANTES, V., MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by White and Brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 30, p. 562-565, 2002.

MINUSSI, R. C., MORAES, S. G., PASTORE, G. M.; DURAN, N.. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in applied Microbiology**, n. 33, p. 21-25, 2001.

MONTANO, J. G.; TORRADES, F.; PEREZ-ESTRADA, L. A. P.; OLLER, I. MALATO, S.; MALDONADO, M. I.; PERAL, J. Degradation pathways of the commercial reactive azo dye Procion Red H-E7B under solar-assisted photo-Fenton reaction. **Environ Sci Technol.**, v. 42(17), p. 6663-70, 2008.

MONTANO, J. G. **Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for commercial reactive azo dyes removal.** 2007. 262 f. Tese (Doutorado em química). Universidade de Barcelona, Bellaterra, 2007.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi.** Inc. 4th ed. New Jersey. Prentice-Hall, 1996.

MORAES, S. G. **Processos fotocatalítico combinado com sistemas biológicos no tratamento de efluentes têxteis.** 1999. Tese (Doutorado em química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MOREIRA- NETO, S. L. et al. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Submetido. 2011.

MOREIRA-NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1075-1082, 2009.

MOREIRA- NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

NEILANDS, J. B. Methodology of siderophores. Siderophores from microorganisms and plants. **Structure and Bonding**, v. 58, p. 1-24, 1984.

NEWCOMBE, D. et al. Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 506-517, 2002.

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e Foto-Fenton. **Química nova**, v. 30, p. 400-408, 2007.

OKADA, W. S. **Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 16, p. 889-893, 2000.

OLIVEIRA, L. H. S.; BARRETO, M. B; VITALI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, v.33, p. 85-99, 2010.

PARANHOS, A. P. S. **Avaliação da produção de quelantes de ferro por fungos basidiomicetos e degradação de corantes da indústria têxtil.** São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2007.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R.; FUNK, D.; GOODELL, B. Synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 674– 679, 1999.

PERES, C.S.; ABRAHÃO, A. J. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. **Revista química têxtil**, v. 21, p. 22-39, 1998.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.57, p. 20–33, 2001.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASILCHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A Review. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

RENSHAW, J.C.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J.; WIEBE, M. G.; LIVEN, F. R.; COLLISON, D.; TAYLOR, R. J. Fungal siderophores: structures, function and applications. **Review. Mycol. Res**, v. 106 (10), p. 1123-1142, 2002.

RIGAS, F.; DRITSA, V. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, 120-124, 2006.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, P.; NIGAM, P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. **Enzyme and microbial technology**, v. 29, p. 575-579, 2001.

RODRIGUES, T. A. **Estudo da interação biosortiva entre o corante reativo procion blue MXG, e as linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 de *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico.** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

SANTIAGO, M. F. **Estudos de substâncias de baixa massa molar que mimetizam as fenoxidases com aplicações em tratamentos de efluentes industriais.** 1999. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SCHLOSSER, D.; FAHR, K.; KARL, W.; WETZSTEIN, H. Hydroxylated metabolites of 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in *Gloeophyllum striatum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 2479-2483, 2000.

SCHMIDT, C. J.; WHITTEN, B. K.; NICHOLAS, D. D. A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi. **American wood preservers association**, v. 77, p.157-164, 1981.

SCHWYN, B.; J. B. NEILANDS. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SHIMADA, M.; AKAMTSU, Y.; TOKIMATSU, T.; MII, K.; HATTORI, T. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 103–113, 1997.

SHIMOKAWA, T.; NAKAMURA, M.; HAYASHI, N.; ISHIHARA, M. Production of 2,5- dimethoxyhydroquinone by the brown-rot fungus *Serpula lacrymans* to drive extracellular Fenton reaction. **Holzforschung**, v. 58, p. 305-310, 2004.

SOUZA, C.R.L.; PERALTA-ZAMORA P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/ peróxido de hidrogênio. **Química nova**, v. 28, n. 2, p. 226-228, 2005.

STOOKEY, L. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 781- 783, 1970.

SUZUKI, M. R.; HUNT, C. G.; HOUTMAN, C. J.; DALEBROUX, Z. D.; AMMEL, K. E. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 2214–2223, 2006.

SWAMY, J. ; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and microbial technology**, v. 24, p. 130 -137, 1999.

SYLVA, R. N. The hydrolysis of iron(III). **Review of Pure and Applied Chemistry**, v. 22, p.115–130, 1972.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Hydroxyk radical generation by an extracellular low- molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the White-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v.75, p. 57- 70, 1999.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; HIRANO, T.; ENOKI, A. Na extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferri iron. **Holzforschung**, v. 50, p. 541-548, 1996.

TANAKA, H.; FUSE, G.; ENOKI, A. 1991. An extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂- reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus, *Irpex lacteus*. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 37, p. 986–988, 1991.

TAUBER, M. M., GUEBITZ, G. M., AND REHOREK, A. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 2600–2607, 2005.

TEKERE, M.; MSWAKA, A.; ZVAUYA, Y. R.; READ, J. S. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 420–426, 2001.

TORRADES F.; MONTAÑO, J. G.; GARCÍA-HORTAL, J. A.; DOMÈNECH, X.; PERAL, J. Decolorization and mineralization of commercial reactive dyes under solar light assisted photo-Fenton conditions. **Solar Energy**, v. 77, p. 573-581, 2004.

TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. AND DURÁN, N. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 97-212, 2005.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 169-183, 2000.

VANDEVIVERE, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, V.72, p. 289 – 302, 1998.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. 1989. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas.

VILLEGAS, M. E. D.; VILLA, P., FRÍAS, A. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. **Revista latinoamericana de microbiologia**, v. 44, p. 112 – 117, 2002.

WANG, W.; HUAGN, F.; LU, X. M.; GAO, P. J. Lignin degradation by a novel peptide, Gt factor, from brown rot fungus *Gleophyllum trabeum*. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 447-453, 2006.

WANG, W.; GAO, P. J. Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gleophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 119-130, 2003.

WANG, W.; GAO, P. A peptide-mediated and hydroxyl radical HO•-involved oxidative degradation of cellulose by brown-rot fungi. **Biodegradation**, v. 13, p. 383-394, 2002.

WANG, W.; LIU, J. C.; GAO, P. J. A peptide-mediated Fenton reaction in wood degrading fungi. **Chinese Chemical Letters**, v. 13, p. 773-776, 2002.

WETZSTEIN, H. -G.; SCHMEER, N.; KARL, W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, p.4272-4281, 1997.

WINKELMANN, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. **Biometals**, v. 20, p. 379–392, 2007.

WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. 1994. Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis In: RATLEDGE, C. (Ed.). **Biochemistry of microbial degradation**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 197-231.

XU, G.; GOODELL, B. Mechanism of wood degradation by brown-rot fungi: chelator mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 27, 43-57, 2001.

YAMANAKA, R. ; SOARES, C. F. ; MATHEUS, D. R. ; MACHADO, K. M. G. Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1-7, 2008.

YANG, W.; LIU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; GAO, P. Function of a low molecular peptide generated by cellulolytic fungi or the degradation of native cellulose. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 1799-1802, 2004.

YOUNES, S. B.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1033–1042, 2007.

Zhao, X & Hardin, I. R. 2007. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, 73: 322- 325.

(*) De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.