

DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMICETOS TROPICAIS BRASILEIROS

Luísa Helena dos Santos Oliveira¹, Mariana Barbosa Barreto¹, Vera Maria V. Vitalli²,
Kátia Maria Gomes Machado³, Dácio Roberto Matheus¹

¹ - UFABC, Universidade Federal do ABC – CECS - Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais – CECS, Avenida dos Estados, 5001, Bloco A, Torre 1, 7º andar - Bairro Bangú, 09.210-170, Santo André, SP,

² - Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Liquenologia, Av. Miguel Stéfano 3687, Água Funda, 04.301-903, São Paulo, SP.

³ - UNISANTOS – Universidade Católica de Santos, Centro de Biotecnologia, Avenida Conselheiro Nébias, 300, Vila Mathias, 11.015-002, Santos, SP.

ABSTRACT

This research study aimed to evaluate the viability of the 2 cultures of basidiomycetes isolated from tropical ecosystems - *Peniophora cinerea* (CCB 204) and *Trametes villosa* (CCB 291) - the removal of textile dyes in aqueous synthetic medium. Discs of mycelium growth of both cultures were inoculated in 250 mL frasks containing 50 mL of liquid medium (g / L): ammonium tartrate 0.45 g, 0.049 g CuSO₄, 0.05 g MgSO₄, MnSO₄ 0.016 g KH₂PO₄ 0, 2g. Incubation was done in a stationary room temperature for 7 days. We evaluated concentrations of sucrose and 0.3%, 0.5%, 0.7% and 1.0% as carbon source. Glucose (0.5%) was used as control, in triplicate. The percentage of decolorization of artificial textile effluent (3% NaCl, 0.2% of dye: Remazol Brilliant Blue-RBBR-Sigma, Yellow Cibacron or Red Cibacron) was evaluated *in vivo* and *in vitro* for both cultures, without adjustment pH, the change of absorbance (592, 432, 526 nm, respectively) 24 hours after addition of 5 mL of each effluent fungal growth. It was concluded that the highest percentage of dyes decolorization were obtained by treatment *in vivo* and *in vitro* cultures using both CCB 204 and CCB 219, grown in basal medium with 0.5% and 0.7% sucrose, reaching values up to 94.18%. However, both strains showed lower rates of decolorization of Cibacron Red, both *in vivo* as *in vitro*, suggesting that another mechanism may be involved in enzymatic decolorization of this dye.

Key words: Remazol Brilliant Blue-RBBR-Sigma, Yellow FN-2R Cibacron, Red FN-2BL Cibacron, textile effluents, *Peniophora cinerea* (CCB 204), *Trametes villosa* (CCB 291)

RESUMO

A presente pesquisa visou avaliar a viabilidade do emprego de 2 culturas de basidiomicetos isolados de ecossistemas tropicais - *Peniophora cinerea* (CCB 204) e *Trametes villosa* (CCB 291) - na remoção de corantes têxteis em meio aquoso sintético. Discos de crescimento micelial de ambas as culturas foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido contendo (g/L): tartarato de amônia 0,45g, CuSO₄ 0,049g, MgSO₄ 0,05g, MnSO₄ 0,016g e KH₂PO₄ 0,2g. A incubação foi feita de maneira estacionária, temperatura ambiente, durante 7 dias. Foram avaliadas concentrações de sacarose a 0,3%, 0,5%, 0,7% e 1,0% como fonte de carbono. Glicose (0,5%) foi usada como controle, em triplicata. A porcentagem de descoloração do efluente têxtil artificial (3% de NaCl, 0,2% de corante: Azul Brilhante de Remazol -RBBR-Sigma, Amarelo Cibacron ou Vermelho Cibacron) foi avaliada *in vivo* e *in vitro* para ambas as culturas, sem ajuste de pH, pela variação das absorbâncias (592, 432, 526 nm, respectivamente), 24 horas após a adição de 5 mL de cada efluente ao crescimento fúngico. Concluiu-se que, as maiores porcentagens de descoloração dos corantes foram obtidas pelo tratamento *in vivo* e *in vitro*, utilizando ambas as culturas CCB 204 e CCB 219, cultivadas em meio basal com 0,5% e 0,7% de sacarose, alcançando valores até 94,18%. Entretanto, ambas as linhagens apresentaram menores taxas de descoloração do Vermelho Cibacron, tanto "in vivo" quanto "in vitro", sugerindo que outro mecanismo enzimático pode estar envolvido na descoloração deste corante.

Palavras-chave: Remazol Brilhante Blue R, Amarelo FN-2R Cibacron, Vermelho FN-2BL Cibacron, efluentes têxteis, *Peniophora cinerea* (CCB 204), *Trametes villosa* (CCB 291).

INTRODUÇÃO

O problema da poluição ambiental pela contaminação dos cursos hídricos, mediante o lançamento dos efluentes industriais, desde o período da Revolução

Industrial, tem caráter mundial. Esta situação vem intensificando-se com o crescimento das disparidades em diversas regiões.

No entanto, apesar do setor têxtil, no Brasil, colaborar para a geração de aproximadamente 1,4 milhão de trabalhadores e um volume de negócios no valor de US\$ 20 bilhões, este é responsável por causar diversos impactos ambientais, devido à presença de corantes de difícil remoção em seus efluentes (DULIUS, 2004). Neste enfoque, apesar de reconhecer a representatividade do setor para o desenvolvimento econômico nacional e regional, verifica-se a necessidade de tecnologias capazes de minimizarem os danos que o setor pode causar para o meio ambiente. Estima-se que, de uma forma geral, 20% dos corantes têxteis utilizados no tingimento dos tecidos sejam descartados em efluentes devido às perdas ocorridas durante o processo (VAZOLLER, 2002).

A poluição de corpos d'água com estes corantes podem provocar, além da poluição visual, alterações nos ciclos biológicos afetando principalmente processos de fotossíntese, sendo que estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azocorantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (DELLAMATRICE, 2005).

Segundo Zanoni & Carneiro (2002), os problemas ligados aos efeitos poluentes dos corantes têxteis, estão em alguns casos relacionados a etapa de tintura da fibra, onde, alguns corantes, a partir da sua degradação, chegam a liberar substâncias tóxicas além de altas concentrações de metais pesados que podem ser acumulados por plantas expostas a efluentes da indústria têxtil e conseqüentemente passar para a cadeia alimentar, contaminando outros organismos.

Conforme Dellamatrice (2005), além da liberação de substâncias tóxicas durante a etapa de tingimento, os corantes têxteis apresentam uma estrutura molecular complexa que impede a sua remoção quando presente nos efluentes, através das técnicas convencionais de tratamento.

Os corantes sintéticos são extensivamente utilizados na indústria têxtil, gráfica, fotográfica e como aditivos em derivados de petróleo. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, o que representa um consumo anual de cerca de 8×10^5 toneladas no mundo (REVANKAR & LELE, 2007).

Conforme, Kunz et al. (2002), existem vários grupos cromóforos que são utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado é o pertence à família dos azocorantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos (N=N) que estão ligados à sistemas aromáticos. Os azocorantes representam cerca de 60 % dos corantes atualmente utilizados no mundo, sendo extensivamente utilizados pelas indústrias têxteis, como os corantes Amarelo FN-2R Cibacron (CI 14.030), Remazol Brilliant Blue R (CI 61.200) e Vermelho FN-2BL (CI 16.255) Souza & Rosado (2009).

Como mencionado anteriormente, os corantes têxteis do grupo AZO são de difícil remoção, pois apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver, durante seu processo de síntese, até 500 reações intermediárias sendo estas características responsáveis pelo difícil processo de remoção dos corantes

quando presentes em efluentes líquidos, tornando os sistemas de tratamento convencionais, usualmente empregados, em parte ineficientes (VAZOLLER, 2002).

De acordo com Kunz et al. (2002), as técnicas de tratamento de efluentes, têxteis, fundamentadas em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam uma elevada eficiência na remoção de materiais particulados. No entanto, a remoção dos corantes têxteis, e outros compostos orgânicos dissolvidos presentes em efluentes, mostram-se deficientes. A maioria dos tratamentos acima citados geram um passivo ambiental na forma de lodo, que é normalmente classificado como resíduo de classe I, segundo a NBR 10.004 e deve ser descartado num aterro de resíduos industriais perigosos.

No que se refere à remoção dos corantes têxteis presentes nos efluentes industriais, novas tecnologias têm sido buscadas no sentido de minimizar os danos ambientais que estes podem ocasionar, e entre estas tecnologias, destaca-se a biodegradação.

Assadi (2001) destaca que em alguns processos de biodegradação de poluentes presentes nos efluentes, são incorporados uma variedade de espécies microbianas e, portanto, uma versatilidade metabólica bastante grande destas que são capazes de degradar compostos complexos e artificialmente sintetizados. Alguns destes processos possuem microrganismos que apenas degradam moléculas orgânicas simples, como o ácido acético, produzindo gás metano. Os microrganismos utilizados na biodegradação são fungos e bactérias.

Souza & Rosado (2009) destacam que entre os microrganismos (fungos e bactérias) que podem ser utilizados para o desenvolvimento destas técnicas de biodegradação, os fungos apresentam importante capacidade em degradar as moléculas mais complexas através da produção de enzimas específicas.

Os fungos, por exemplo, possuem uma grande capacidade de degradar parcialmente, e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes a degradação, através da ação de enzimas específicas produzidas por estes microrganismos. Estas enzimas apresentam grande capacidade em despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos, especialmente dos corantes presentes nos efluentes têxteis (CARVALHO, 2005). Como exemplo, pode-se citar os estudos realizados por Kirby et al. (1995), quando estudando a capacidade de descoloração dos fungos frente a uma amostra de efluente simulada em laboratório, observou a degradação total deste corante após o período de 3 a 5 dias de tratamento.

Couto et al. (2000), também observaram uma excelente eficiência no tratamento de uma amostra contendo uma solução de corante (poli-R-478), alcançando remoções superior a 95 % após o tratamento com fungos, no caso o *Phanerochaete chrysosporium*.

A utilização de outros fungos como, por exemplo, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* para degradação de corantes também vem sendo estudada. Segundo Rodríguez (2000), estes fungos caracterizam-se por serem bons produtores de lacase. Esta enzima tem a capacidade de catalisar reações de desmetilação, que é um importante passo na degradação destes xenobióticos.

Resultados sobre a micorremediação são promissores (POZDNYAKOVA et al., 2004). Entretanto são necessários mais estudos para melhor aplicabilidade e maior compreensão dos mecanismos de biodegradação, bem como, das interações com o ecossistema onde for inserido (SILVA & ESPOSITO, 2004).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de remoção de corantes azóicos, como RBBR (Remazol Brilhante Blue R), Vermelho e Amarelo Cibacron em meio sintático por culturas pré-selecionadas e identificadas de fungos basidiomicetos isolados de ecossistemas tropicais. Com isso, espera-se que sua utilização no tratamento do meio contendo corantes têxteis possa resultar em sistema de eficiência elevada, visando como produto final efluente de alta qualidade para o descarte no meio ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos utilizados

Neste experimento foram utilizadas as culturas CCB 291 (*Trametes villosa*) e 204 (*Peniophora cinerea*), obtidas da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica (CCB/ Instituto de Botânica), com comprovada capacidade de descolorir corantes sintéticos (OKINO et al., 2000; MACHADO et al., 2005, 2006), sendo mantidas por repiques sucessivos em placas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA), à 4 °C.

Condições de cultivo

O crescimento fúngico foi feito em frascos de 250mL, contendo 50mL de meio líquido basal (KIRK et al., 1978), modificado (MACHADO et al., 2006), acrescido do corante ou efluente artificial. A constituição final do meio foi (em 1L): glicose 5g, tartarato de amônia 0,45g, CuSO₄ 0,049g, MgSO₄ 0,05g, MnSO₄ 0,016g, KH₂PO₄ 0,2g e solução tampão citrato-fosfato pH 4,7 10 mL. A incubação foi feita de maneira estacionária, à temperatura ambiente. O meio de cultivo foi alterado de forma a avaliar:

- i) Utilização de sacarose em diversas concentrações (0,30%, 0,50%, 0,70% e 1,00%);

Os experimentos tiveram como controle a glicose 0,5% e foram realizados em triplicata.

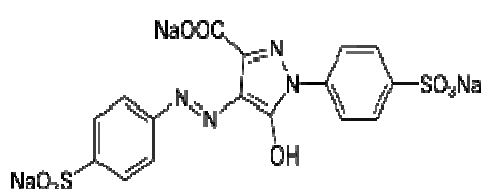
Em determinados intervalos de tempo, o conteúdo do frasco foi filtrado e utilizado para determinar a degradação *in vivo* e *in vitro* do corante. O experimento foi realizado em triplicata e submetido a tratamento estatístico.

Manutenção e propagação dos fungos estudados

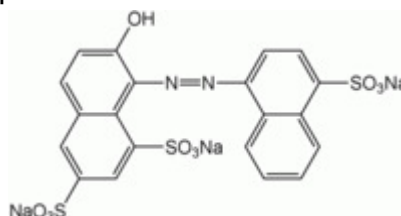
O meio utilizado para manutenção e propagação dos fungos foi o meio BDA (Batata Dextrose Agar), com a seguinte composição em g/L: caldo de batata (300 mL); Glicose 10,0; Ágar 20,0. Foram feitos repiques sucessivos das culturas em placas de Petri contendo BDA e estocadas à 4°C.

Corantes e efluente têxtil sintético

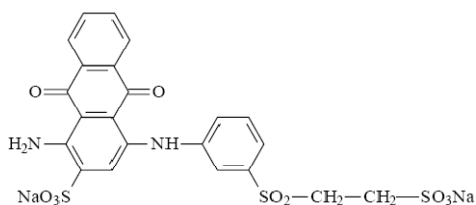
Foram utilizados os corantes reativos: Remazol Brilhante Blue R - RBBR (CI 61.200), Amarelo FN-2R (CI 14.030) e Vermelho FN-2BL (CI 16.255), marca Cibacron. O efluente sintético foi obtido pela solução 0,2% dos corantes individuais e adição de 3%, sem ajuste de pH.



a) Amarelo FN-2R Cibacron



b) Vermelho FN-2BL Cibacron



c) Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

Figura 1. Estrutura química dos corantes utilizados nos experimentos.

Descoloração *in vivo* do Efluente Têxtil Artificial

Após 7 dias de cultivo, 5 ml de solução do efluente têxtil artificial foram adicionados a cada frasco. Então, foram retiradas alíquotas diretamente dos frascos de incubação, sem que houvesse filtração dos micélios para que, após diluição de 1:5, as amostras fossem analisadas. Em espectrofotômetro (B380 Micronal) nos comprimentos de ondas de 592nm (máximo do RBBR), 432 nm (máximo do Amarelo FN-2R), 526 nm (máximo do Vermelho FN-2BL), foram determinadas as absorvâncias da coloração logo após a adição do efluente. Esta primeira leitura estabeleceu um parâmetro de controle, como 100% de cor (Tempo 0 hora). A descoloração *in vivo* foi avaliada após 24 horas da adição do efluente.

Descoloração *in vitro* do Efluente Têxtil Artificial

Após 7 dias de cultivo, o conteúdo do frasco foi filtrado e 5 ml de efluente têxtil foram adicionados a 45ml do extrato enzimático. No tempo zero, foi retirada uma alíquota do frasco e, após diluição 1:5, foi feita uma análise por espectrofotometria em comprimento de onda de 592nm (máximo do RBBR), 432 nm (máximo do Amarelo FN-2R), 526 nm (máximo do Vermelho FN-2BL). Esta primeira alíquota foi considerada o controle da cor (100% de cor); após 24 horas

outra alíquota foi retirada do frasco de cultivo e assim utilizada para determinar a descoloração *in vitro* do efluente têxtil artificial.

Cálculo da descoloração

A porcentagem de descoloração foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de descoloração} = 100 - (A \times 100) / A_0$$

Sendo: A_0 = absorbâncias do controle 100% de cor (leitura do extrato no tempo zero hora), e A = absorbâncias do extrato após 24 horas de descoloração.

Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos serão testados com três repetições, sendo obtidas as médias dos resultados e desvio padrão, sendo analisada a significância dos tratamentos através de análise de variância, teste de Tukey-Kramer ou Student, dependendo do caso, através do programa estatístico INSTAT (Rutger University).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da degradação dos corantes

A habilidade das duas culturas fúngicas em degradar os três tipos de corantes reativos foi testada. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 1, onde foi observado que todos os corantes foram degradados em graus variados de acordo com a espécie fúngica, a porcentagem da fonte de carbono e o tratamento utilizado.

Quanto à descoloração do corante RRBR pelas culturas em cultivo a 0,3% de sacarose, os maiores percentuais de diminuição da concentração do corante foram observados para CCB 204 (*Peniophora cinerea*) no tratamento *in vivo* (86,19%), seguido pelo tratamento *in vitro* (53,61%), quando comparada com cultura CCB 291 (*Trametes villosa*) (FIGURA 2). O mesmo pode ser observado quando as culturas foram cultivadas a 0,5% e 0,7% de sacarose (TABELA 2). Entretanto, quando cultivadas a 1,0% de sacarose e 0,5% de glicose, os maiores resultados de descoloração foram dados pela linhagem CCB 291, no tratamento *in vivo* (FIGURA 3).

Tabela 1. Percentual de descoloração dos corantes sintéticos por tratamento *in vivo* e *in vitro* pelas culturas fúngicas cultivadas em diferentes porcentagens de fonte de carbono, no meio líquido basal (KIRK et al., 1978), modificado (MACHADO et al., 2006), acrescido do corante.

Isolados	% Fonte de C	% descoloração <i>in vivo</i>			% descoloração <i>in vitro</i>		
		* RBBR	VC	AC	* RBBR	VC	AC
CCB 204	0,3% sac ¹	86,19	37,77	17,31	53,61	51,96	25,21
CCB 204	0,5% sac ¹	89,54	50,09	89,97	44,90	48,69	79,80
CCB 204	0,7% sac ¹	59,66	23,07	75,40	21,84	52,50	88,90
CCB 204	1,0% sac ¹	32,55	33,78	66,65	62,08	26,30	33,33
CCB 204	0,5% gli ²	28,80	65,83	80,75	43,54	23,50	80,58
CCB 291	0,3% sac ¹	47,36	41,65	26,38	28,88	15,42	27,70
CCB 291	0,5% sac ¹	49,53	12,46	92,00	16,15	9,31	94,18
CCB 291	0,7% sac ¹	28,89	54,55	80,18	40,12	5,85	76,91
CCB 291	1,0% sac ¹	71,50	84,66	77,96	37,45	25,72	73,26
CCB 291	0,5% gli ²	38,91	70,30	70,45	60,07	7,30	46,62

*RBBR (Remazol Brilliant Blue R); VC (Vermelho FN-2BL Cibacron); AC (Amarelo FN-2R Cibacron)

¹sac – sacarose; ²gli – glicose

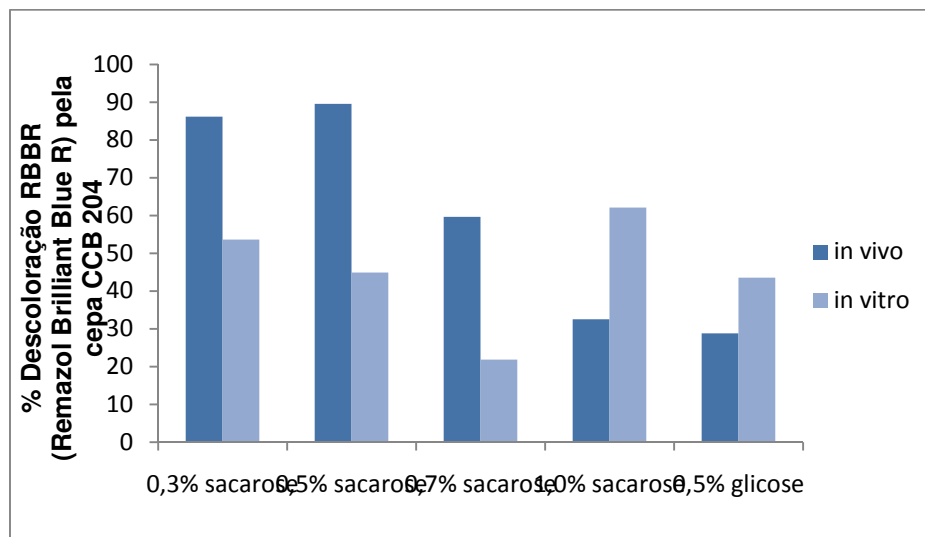


Figura 2. % Descoloração de RBBR (Remazol Brilliant Blue R) pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

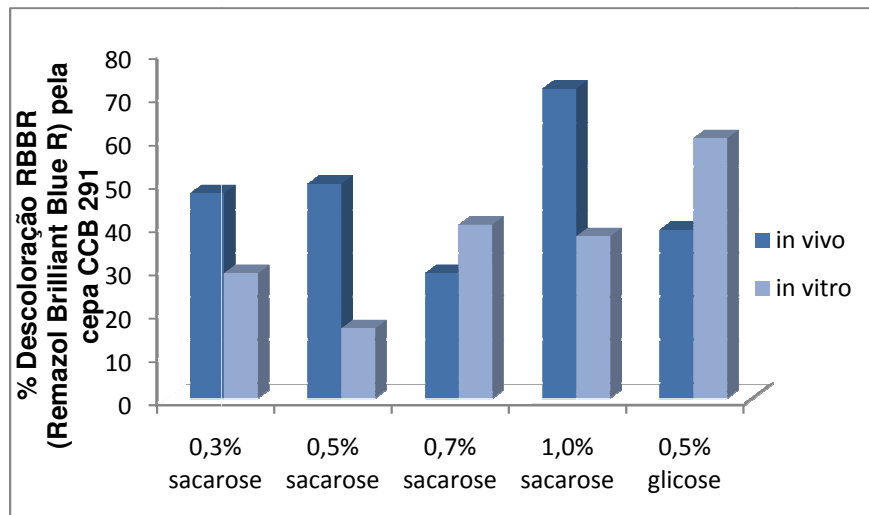


Figura 3. % Descoloração de RBBR (Remazol Brilliant Blue R) pelo extrato cru obtido de CCB 291 (*Trametes villosa*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Pode-se concluir que, os dois isolados fúngicos foram eficientes na remoção da cor do corante RBBR durante 7 dias de crescimento, alcançando valores variando de 89,54% a 49,53 (tratamento *in vivo*) em cultivo a 5% de sacarose, seguido pelo mesmo tratamento, em cultivo a 0,3% de sacarose (FIGURA 4).

Quando analisadas as condições de cultivo, como porcentagens das fontes de carbono (sacarose) e sua influência na decoloração do corante RBBR pelas culturas CCB 204 e CCB 291, pode-se perceber um aumento na % de decoloração utilizando 0,5% de sacarose no tratamento *in vivo* (FIGURA 4), sendo destaque a cultura CCB 204 comparada a CCB 291.

Um estudo de biodegradação de azo corantes pela levedura *Cândida zeylanoides* em culturas aeradas foi feita por Martins et al. (2003). O meio de cultura continha glicose como fonte de carbono e energia, e seu pH foi controlado entre 5,0-5,2. A extensão da remoção da cor ao meio de cultura foi avaliada através da diminuição da absorbância do sobrenadante. O resultado obtido foi de uma remoção de cor entre 44-90%, após sete dias. Resultados semelhantes foram observados pela linhagem CCB 291 utilizando 0,3% sacarose (47,36%) e 0,5% sacarose (49,53%) como fonte de carbono e energia, no tratamento *in vivo*.

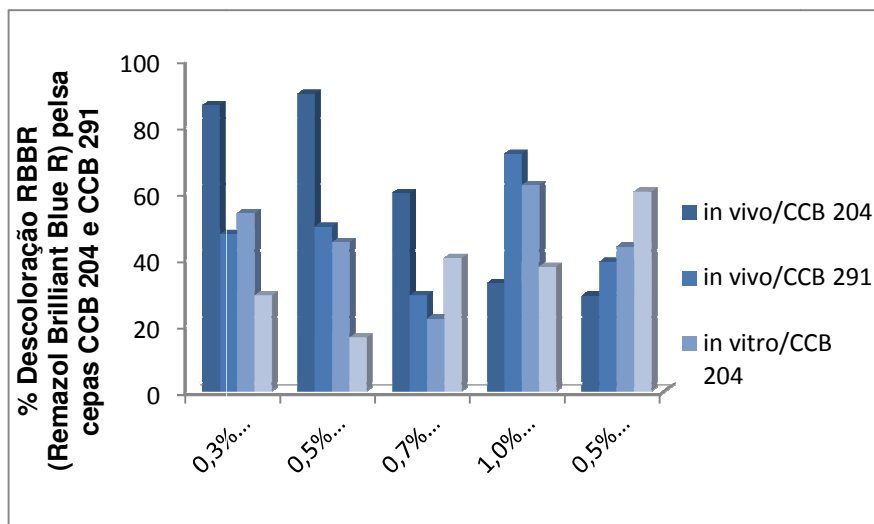


Figura 4. % Descoloração de RBBR (Remazol Brilliant Blue R) pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) e CCB 291 (*Trametes villosa*) crescidos em meio líquido modificado (YAMANAKA at al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Silva et al. (2004) estudaram o potencial enzimático de oito linhagens fúngicas, agrupadas em três gêneros: *Ganoderma* sp., *Funalia* e *Trametes*. Das oito linhagens cultivadas em meio líquido de king suplementado com 0,05% do corante remazol brilhante R (RBBR), apenas duas (P3SA1F e P11SA2F) apresentaram descoloração de 42% e 47% do RBBR, sugerindo a possibilidade de aplicação desses organismos em estudos de despoluição de produtos tóxicos ao meio ambiente. Estes resultados quando comparados aos encontrados neste trabalho permitem inferir que o isolado CCB 291 (*Trametes villosa*) também pode ser aplicado na biorremediação de efluentes industriais.

Entretanto, é importante ressaltar que as condições culturais podem afetar a fisiologia e metabolismo do fungo, ativando suas enzimas. Foi estudada a descoloração de vários corantes e de um efluente industrial utilizando o fungo *P. chrysosporium* em culturas estáticas e sob agitação. Tanto o efluente como os corantes foram descoloridos com porcentagens de remoção de cor que variam entre 20-100%. O grau de descoloração para todos os corantes em condições estáticas foi menor que nas culturas que ficaram sob agitação e também dependeu da concentração da biomassa. Os autores compararam os diferentes corantes, com as diferentes porcentagens de descoloração, e chegaram a um consenso que pequenas diferenças estruturais podem afetar fortemente o grau de descoloração. Mais estudos de células homólogas de corantes com diferentes fungos são necessários para estabelecer a relação entre estrutura e degradabilidade (SANI & BANERJEE, 1998).

Pesquisadores têm demonstrado que a agitação de espécies fúngicas em meios líquidos aumenta a eficiência dos isolados na remoção da cor de corantes.

Swammi & Ramsai (1999) observaram que o percentual de descoloração de corantes azóicos foi maior com os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *T. versicolor* e *Bjerkandera* quando submetidos à agitação. O mesmo foi relatado por Ge et al. (2004) ao submeterem *Phanerochaete sordida* ao aumento da velocidade rotacional (rpm), o que explicaria, em parte, as diferenças encontradas neste trabalho quanto aos percentuais de descoloração.

Espécies de basidiomycetes têm reconhecida habilidade em degradar corantes, através da ação de enzimas do sistema lignocelulolítico como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, encorajando a busca de organismos biológicos para esse fim (LEONOWICZ et al., 1999; SILVA et al., 2003). Estas enzimas atuam sobre compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (KARAM & NICELL, 1997).

Pode-se observar que, tanto o tratamento *in vivo* quanto *in vitro* com a cultura CCB 204 foram extremamente significativos (Tukey-Kramer $p=0,0003$) e superiores para o RBBR, quando comparado com cultura CCB 291. Entretanto, as porcentagens de descoloração *in vivo* e *in vitro* para o mesmo corante, entre as culturas CCB 204 e CCB 291 cultivadas em 0,3% e 0,5% de sacarose não apresentaram diferenças significativas entre si (Tukey-Kramer $p<0,05$).

Já as porcentagens de descoloração *in vivo* e *in vitro* utilizando a cultura CCB 291 foram inferiores e não apresentam diferenças entre si (Tukey-Kramer $p=0,0999$).

Quando analisada o percentual de descoloração do corante Vermelho, pode-se observar que as maiores porcentagens de descoloração foram obtidas pela cepa CCB 291 (FIGURA 5), apresentando valores de 12,46% (0,5% de sacarose) a 84,66% (1,0% de sacarose), no tratamento *in vivo*. Diferentemente, no tratamento *in vitro*, destacaram-se as descolorações obtidas com a cepa CCB 204 (FIGURA 6), demonstrando que ambas são dependentes tanto das concentrações das fontes de carbono como do tipo de tratamento utilizado.

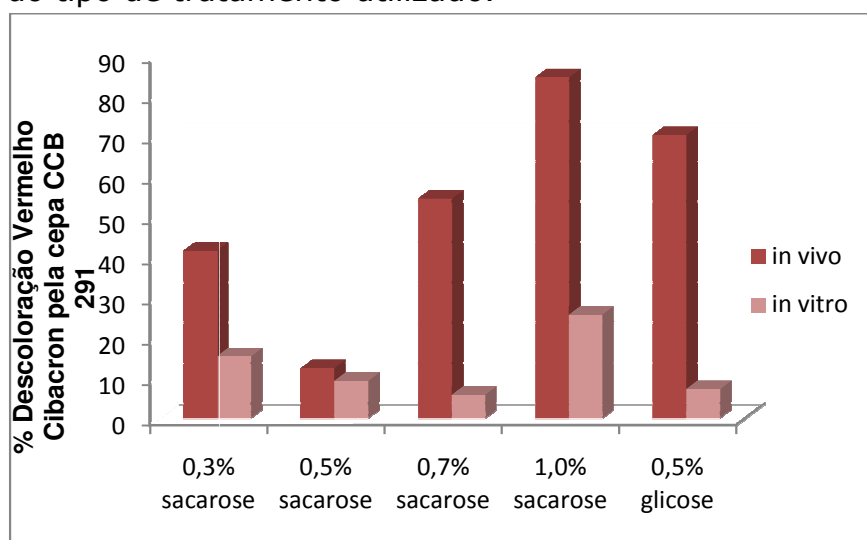


Figura 5. % Descoloração de Vermelho Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 291 (*Trametes villosa*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

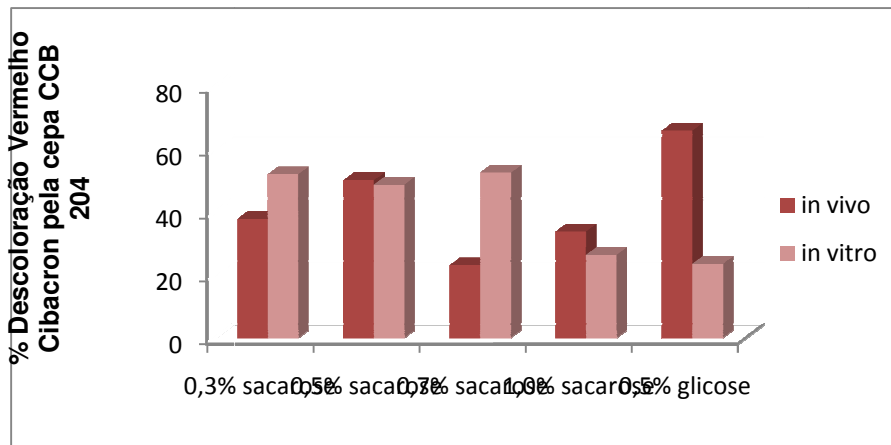


Figura 6. % Descoloração de Vermelho Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Analisando ambas as culturas na descoloração do corante Vermelho, podemos destacar os resultados obtidos pela linhagem CCB 291 (FIGURA 7), no tratamento *in vivo*, quando comparada com a cepa CCB 204.

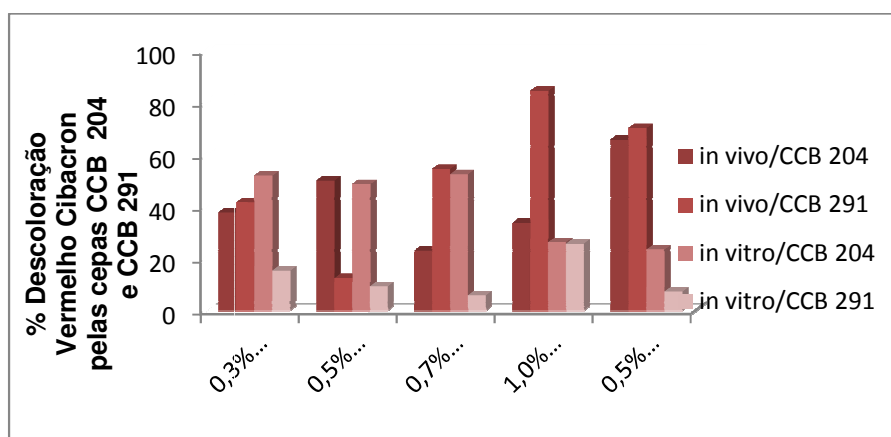


Figura 7. % Descoloração de Vermelho Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) e CCB 291 (*Trametes villosa*) crescidos em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Observou-se que, tanto o tratamento *in vivo* quanto *in vitro* com a cultura CCB 204 foram extremamente significativos (Tukey-Kramer $p=0,0003$) e superiores para o Vermelho Cibacron, quando comparado com cultura CCB 291. Já as porcentagens de descoloração *in vitro* utilizando a cultura CCB 291 foram superiores para este corante e extremamente significativas (Tukey-Kramer $p=0,0003$). Quanto à descoloração *in vivo*, os resultados para esta mesma cultura foram inferiores e não apresentam diferenças entre si (Tukey-Kramer $p=0,0999$).

Na descoloração do corante Amarelo Cibacron, destacaram-se as porcentagens utilizando 0,5% e 0,7% de sacarose, tanto no tratamento *in vivo* quanto *in vitro*, com a cepa CCB 204 (FIGURA 8). O mesmo foi observado quando utilizado 0,5% de glicose como fonte de carbono.

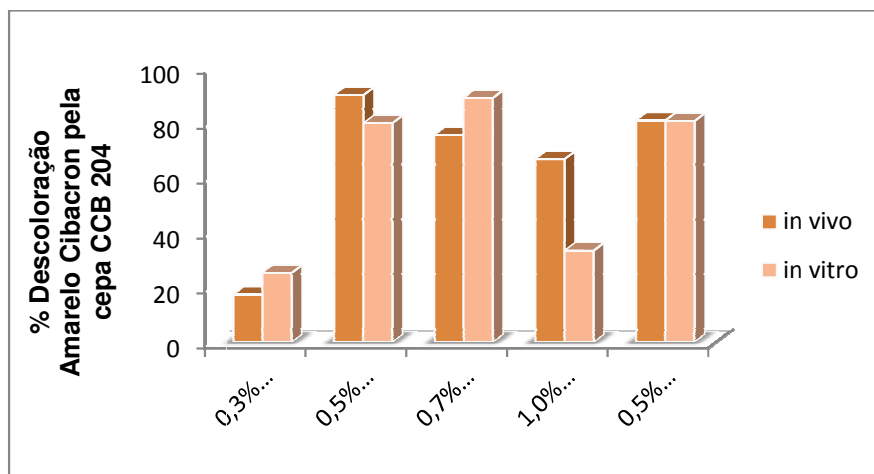


Figura 8. % Descoloração de Amarelo Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA et al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Kirby *et al.* (1995) estudaram a descoloração de um efluente têxtil artificial pelo fungo da podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*), que produz as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Nos ensaios de descoloração, o papel da LiP não ficou claro, pois somente pouca atividade da enzima foi detectada no processo de descoloração dos vários corantes sintéticos estudados separadamente e misturados (efluente artificial). Nesse estudo, a concentração dos corantes foi de 0,5g/L, na presença de glicose (10g/L). Seis corantes testados foram descoloridos, enquanto que na ausência de glicose apenas três. Os resultados sugerem que uma fonte primária de carbono (glicose) é essencial para uma descoloração extensiva do corante; no entanto, alguns corantes puderam ser metabolizados como única fonte de carbono e energia pelo *Phanerochaete chrysosporium*.

Pode-se observar, quando utilizado sacarose 0,3% como fonte de carbono, resultados inferiores quanto à descoloração *in vivo* e *in vitro* do corantes amarelo Cibacron, utilizando a cepa CCB 291 (TABELA 1), corroborando com a afirmação dos autores acima, que sugerem que o uso de fontes primárias de carbono, como glicose, seria essencial para a descoloração extensiva de corantes.

Bons resultados na descoloração deste corante também foram obtidos utilizando 0,5%, 0,7% e 1,0% de sacarose com a linhagem CCB 291 (FIGURA 9), tanto no tratamento *in vivo* quanto *in vitro*.

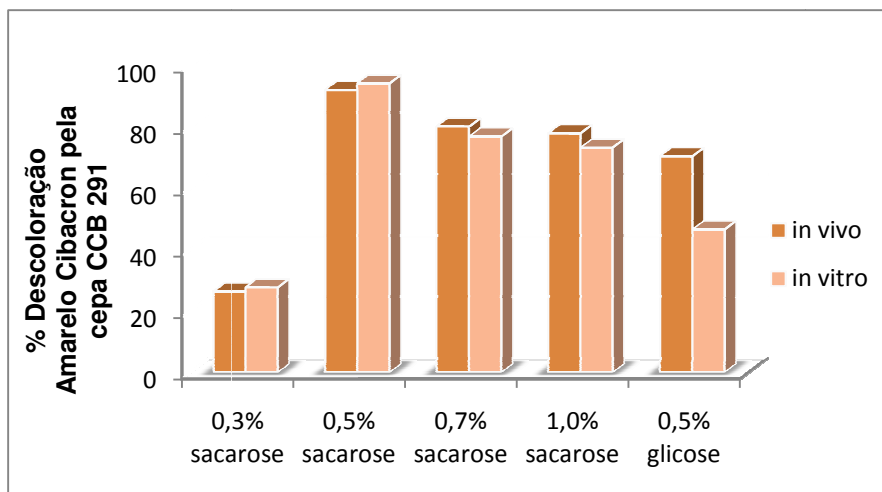


Figura 9. % Descoloração de Amarelo Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 291 (*Trametes villosa*) crescido em meio líquido modificado (YAMANAKA at al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Observando os resultados é possível observar que para o corante amarelo destaca-se a cepa CCB 291, com maiores resultados de descoloração utilizando 0,5% de sacarose (92%) no tratamento *in vivo* e, 94,18% no tratamento *in vitro*, na mesma concentração da fonte de carbono (FIGURA 10).

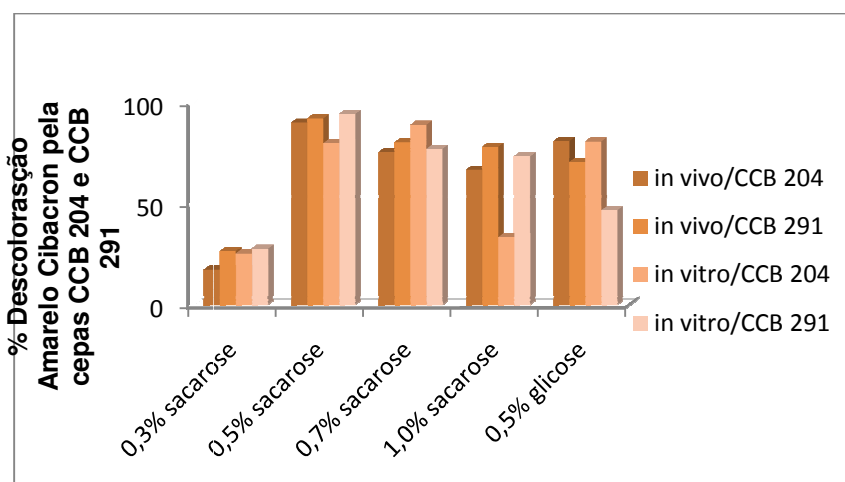


Figura 10. % Descoloração de Amarelo Cibacron pelo extrato cru obtido de CCB 204 (*Peniophora cinerea*) e CCB 291 (*Trametes villosa*) crescidos em meio líquido modificado (YAMANAKA at al., 2008), acrescido de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose), a temperatura ambiente durante 7 dias.

Estatisticamente, tanto o tratamento *in vivo* quanto *in vitro* com a cultura CCB 291 foram extremamente significativos (Tukey-Kramer $p=0,0003$) e superiores para o Amarelo Cibacron, quando comparado com cultura CCB 204. Já as porcentagens de descoloração *in vitro* utilizando a cultura CCB 291 foram superiores para este corante e extremamente significativas (Tukey-Kramer $p=0,0003$).

Quanto à descoloração *in vivo*, os resultados para cultura CCB 204 foram inferiores e não apresentam diferenças entre si (Tukey-Kramer $p=0,0999$).

CONCLUSÕES

As maiores porcentagens de descoloração dos corantes foram obtidas pelo tratamento *in vivo* e *in vitro*, utilizando ambas as culturas CCB 204 e CCB 219, cultivadas em meio basal a 0,5% e 0,7% de sacarose. Entretanto, comparando ambas as culturas, pode-se perceber que percentuais de descoloração inferiores foram apresentadas para o corante Vermelho Cibacron, sugerindo que outro mecanismo enzimático estaria envolvido na descoloração tanto "*in vivo*" quanto "*in vitro*".

REFERÊNCIAS

- ASSADI, I. Decolorization of tanning house effluent by *Aspergillus niger* in tannery industries for biological removal of chromium. Iranian: Biotechnology Division, Research Organization For Science and Technology. 2, n. 3 e 4, 2001.
- CARVALHO, C. C. Produção de Ligninases por Basidiomicetos através de Fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas. (Dissertação – Mestrado) Curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005. 112p.
- COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioprocess and Biosystems Engineering, Berlin, v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.
- DELLAMATRICE, P. M. Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis e Efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana- SP. (Tese – Doutorado) Curso de Pós-Graduação em Ecologia de Agrossistemas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005. 137p.
- DULLIUS, C. H. Utilização de fungos para biodegradação de corantes têxteis sintéticos. (Dissertação – Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional. Universidade de Santa Cruz do Sul, 2004. 90p.
- KARAN, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in wastes treatment. J. Chem. Technol. Biotechnol., 69: 141-153, 1997.
- KIRBY, N.; MULLAN, G. MC.; MERCHANT, R. Biodegradation of textile dyes. Biotech. Lett. 74-179, 1995.
- KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CORNNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol., 117: 277-285, 1978.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. Química Nova, 25: 78-82, 2002.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREZK, J. et al. Biodegradation of lignin by White rot fungi. Fungal Genetics and Biology, 27, p. 175-185, 1999.
- 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, 37: 468-473, 2006.

- MACHADO, K.M.G., MATHEUS, D.R. & BONONI, V.L.R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 297-310, 2005a.
- MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. Ligninolytic Enzymes Productions and Remazol Brilliant Blue R Decolorization by Tropical Brazilian Basidiomycetes Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, p. 246-252, 2005b.
- MARTINS, M. A. M.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.D.; QUEIROZ, M.J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*, 52: 967 – 973, 2003.
- OKINO, L.K.; MACHADO, K.M.G.; FABRIS, C.; BONONI, V.L.R.. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 16: 889-893, 2000.
- POZDNYAKOVA, N.N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O.V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, 30: 19-24, 2004.
- REVANKAR, M.S.; LELE, S.S. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp WR-1. *Biores. Technol.*, 98, 7: 75-780, 2007.
- RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye ecolORIZATION by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38, p. 27-38, 2000.
- SANI, R.K. & BANERJEE, U. C. Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica*, 43: 85-88, 1998.
- SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.; OLIVEIRA, P.R. Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 53-55, 2003.
- SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.; OLIVEIRA, P.R. Produção de enzimas ligninocelulolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento/Embrapa Meio Ambiente*, 2004. 18p.
- SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental.. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, p. 337 –378, 2004.
- SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009
- 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.
- VAZOLLER, R. F.. *Manual Técnico sobre Microbiologia de Lodos Ativados*. São Paulo: CETESB, 2002.
- YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 78-84, 2008.
- ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A . O descarte dos corantes têxteis. *Revista Ciência Hoje*. São Paulo. Ago. 2002.

