

Flávia A. Neves

Faculdade de Farmácia

Monike F. A. R. Lacerda

PPG - Engenharia do Meio Ambiente

Laurivê A. Santos Júnior

PPG - Engenharia do Meio Ambiente

Flavio Marques Lopes

Faculdade de Farmácia

Mariângela F. Santiago

Faculdade de Farmácia

mariangelafs@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

Coordenação:

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Artigo Original

Recebido em: 12/01/2014

Avaliado em: 05/03/2014

Publicação: 25 de março de 2014

APLICAÇÃO DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA PARA REMOÇÃO DE COR EM SIMULADOS DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Application of white rot fungi on simulated industrial effluents for dye
removal

RESUMO

Os corantes são compostos bastante utilizados por várias indústrias, principalmente o grupo dos azocorantes. Na indústria farmacêutica, os principais representantes desses compostos são os corantes amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo. Tais substâncias oferecem riscos tóxicos, mutagênicos e um enorme impacto ambiental. Este trabalho propõe a utilização de um método biológico de tratamento utilizando fungos de decomposição branca, que produzem enzimas ligninolíticas capazes de degradar um grande número de poluentes. Foram realizados ensaios com os dois corantes citados empregando cinco espécies fúngicas. Foi realizada a análise da relação entre a descoloração e as atividades enzimáticas por um período médio de 25 dias. O fungo que mais se destacou para ambos os testes foi o *Trametes versicolor*, grande produtor de lacase, enquanto que os outros fungos obtiveram apenas uma descoloração sutil. Assim, a lacase teve a relação mais evidente com o processo de remoção de cor.

Palavras-Chave: corante, fungo, enzimas ligninolíticas, descoloração.

ABSTRACT

The dyes are compounds widely used by various industries. The azo-dyes are the most used. The main dyestuffs used by pharmaceutical industry are tartrazine yellow and sunset yellow. These compounds can offer toxic, mutagenic and carcinogenic risks. That study proposes the use of a biological method of treatment using white-rot fungi that produce ligninolytic enzymes to be able to degrade an enormous number of pollutants. Assays were made with the two dyestuffs cited using five fungal species. So, the relationship between the decolourization and enzyme activity was made by an average of 25 days. The best results of the both assays were obtained by *Trametes versicolor*, great producer of the enzyme laccase, while the other fungi reported only a subtle decolourization. Thus, the laccase had a relationship more evident with the removal process color.

Keywords: dyestuff, fungus, ligninolytic enzymes, decolourization.

1. INTRODUÇÃO

Grande quantidade de diferentes corantes químicos é usada em várias aplicações industriais, como na produção de medicamentos, alimentos e em tecidos para confecção do vestuário. Hoje, mais de 90% dos corantes empregados como excipientes em medicamentos são sintéticos. São usados para conferir cor às preparações farmacêuticas os quais são incorporados de forma mais eficiente que a maioria dos compostos orgânicos naturais (GOMES et al, 2007). Dentre os corantes artificiais encontramos: os corantes azo - amarelo tartrazina (amarelo FD&C nº. 5), amarelo crepúsculo (amarelo FD&C nº. 6), Bordeaux S (amaranto ou vermelho FD&C nº. 2) e Ponceau 4R (vermelho FD&C nº. 4) -, a eritrosina (vermelho FD&C nº. 3) e o indigocarmim (azul FD&C nº. 2). E é justamente este grupo pertencente a família dos azocorantes que é o mais empregado, se caracterizando por apresentar um ou mais grupamentos -N=N- ligados a sistemas aromáticos (Fig. 1A).

O lançamento de efluentes industriais em cursos d'água, nos quais estão presentes tais corantes, causa enorme impacto ambiental. Tais resíduos interferem na absorção de luz pelos seres vivos aquáticos e são transportados para os mananciais, promovendo a contaminação da água que abastece a população. Muitas dessas substâncias possuem, ainda, efeitos tóxicos, teratogênicos, carcinogênicos, embriotóxicos, gonadotóxicos, mutagênicos, hepatotóxicos e reações anafilactóides (FERREIRA et al, 2000). Assim, o uso dos corantes azóicos em medicamentos foi eliminado por agências regulamentadoras em vários países como: EUA (1976), Egito (1981), Kuwait (1984), Omã (1986) (GOMES et al, 2007). A Farmacopéia Brasileira (2010) relaciona todos os corantes permitidos para uso em medicamentos. Os corantes azóicos, tanto de origem orgânica como sintética, permitidos para uso farmacêutico são: amarelo ácido, amarelo crepúsculo, azoicorubina, escarlate GN, laranja GGN, ponceau 4R, tartrazina, vermelho 40 e vermelho sólido E. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os corantes amarelo crepúsculo (Fig. 1B) e amarelo tartrazina (Fig. 1C) são amplamente utilizados nas preparações farmacêuticas. Segundo Balbani et al (2006), o corante FD & C Amarelo Nº 6 Crepúsculo foi o corante mais encontrado como excipiente em formulações farmacêuticas seguido do corante FD&C Amarelo Nº 5 Tartrazina. Em sua pesquisa foram analisadas 73 apresentações de fármacos, predominando os medicamentos sem corante (43,8%), seguidos pelos coloridos por

amarelo crepúsculo (15%). Cinco produtos (6,8%) continham mais de um corante. A tartrazina foi encontrada em sete formulações (9,5%).

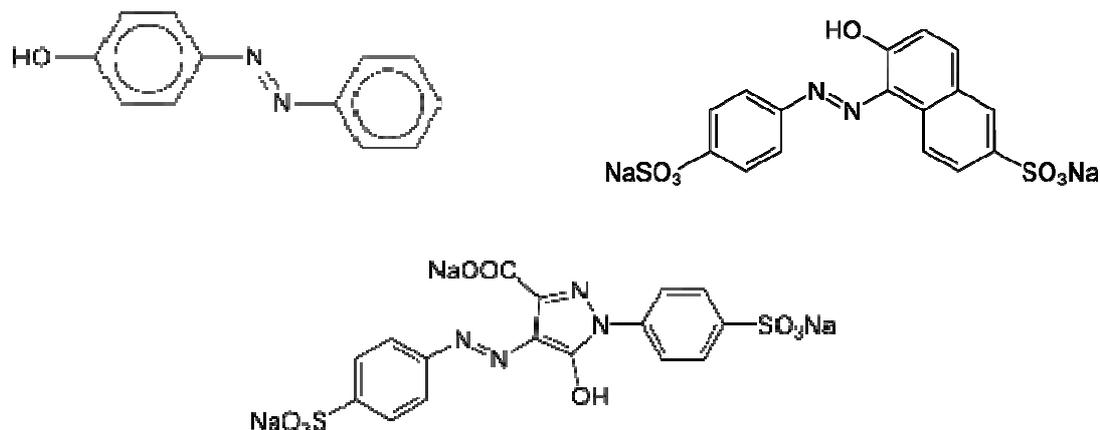


Figura 1 - Estrutura dos corantes químicos - A) Um azo-composto típico, 4-hidroxifenilazobenzeno; B) Corante FD & C Amarelo N^o 6 Crepúsculo; C) Corante FD & C Amarelo N^o 5 Tartrazina.

É necessário investir em técnicas de tratamento eficiente dos efluentes, a fim de minimizar os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Em um processo de descontaminação deve-se observar se o efluente está sendo descolorido, de forma a reduzir o impacto sobre os ecossistemas onde ele é descartado. A descoloração é o primeiro passo para a descontaminação do efluente têxtil. (RODRIGUES et al, 2003). As técnicas de tratamento usualmente empregadas pelas indústrias apresentam algumas desvantagens, como: custo elevado, formação de resíduos tóxicos, grande gasto energético, entre outras (GUARATINI & ZANONI, 2000). As alternativas mais promissoras para resolução de inúmeros problemas ambientais ocasionados pela atividade industrial derivam do estudo de novas tecnologias para o tratamento de efluentes industriais. Nesse contexto, a utilização de processos biológicos baseados na utilização de fungos e bactérias, ou diretamente na utilização de enzimas, tem aparecido como uma das alternativas de grande potencial. Dentre os processos biotecnológicos de tratamento de efluentes têxteis, com o emprego de enzimas, pode-se citar as enzimas ligninolíticas, provenientes de fungos da decomposição branca que têm a habilidade única para degradar/mineralizar um amplo espectro (estruturalmente diverso) de poluentes tóxicos para o meio ambiente. Esses fungos estão se tornando cada vez mais interessantes devido a sua habilidade de degradar poluentes orgânicos

recalcitrantes tais como: hidrocarbonetos, poliaromáticos, clorofenóis e bifenilas policlorados. (OHKUMA et al, 2001).

As enzimas lacase (Lcc), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) têm demonstrado sua capacidade de descolorir os corantes têxteis, mediante a polimerização ou degradação desses corantes. As enzimas LiP e MnP pertencem a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a formação de um radical catiônico. A MnP atua exclusivamente como fenoloxidase em substratos fenólicos utilizando Mn^{2+}/Mn^{3+} como par redox intermediário. A Lcc é considerada verdadeira fenoloxidase e oxida fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (HOFRICHTER, 2002). Alguns fungos apresentam os dois tipos de exoenzimas (peroxidases e lacases) enquanto outros podem ter um ou o outro tipo. Tais enzimas são produzidas durante o metabolismo secundário, quando há escassez nutricional (baixos níveis de C ou N) (WESENBERG et al, 2003).

As diferenças nas taxas de descoloração das diferentes moléculas de corantes devem-se às diferenças estruturais. Pequenas mudanças estruturais podem afetar a descoloração devido às diferenças na distribuição de elétrons, na densidade da carga e dos fatores estéricos (CHAGAS & DURRANT, 2001).

Os corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina são espécies com absorção espectral na região do visível e, em misturas, uma intensa sobreposição espectral das bandas de absorção interfere na aplicação da espectrofotometria direta para análises quantitativas. Em situações como esta, as técnicas derivativas têm sido aplicadas com sucesso para melhorar a sensibilidade e a seletividade das determinações. A espectrofotometria derivativa é atualmente uma ferramenta analítica adicional que auxilia na resolução de diversos problemas analíticos. A derivatização dos espectros permite separar sinais sobrepostos e eliminar "background" causado pela presença de outras espécies na amostra (VIDOTTI, 2006).

Dessa maneira, há a necessidade de analisar a eficiência desta metodologia biológica no processo de remoção de cor, através da utilização de fungos de decomposição branca, correlacionando com as atividades das enzimas Lcc, LiP e MnP. Assim, será possível minimizar drasticamente o impacto ambiental ocasionado pelo lançamento de efluentes industriais, favorecendo principalmente o abastecimento de

pequenas comunidades e unidades fabris interessadas em reuso de água (TOH et al, 2003).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

As espécies de fungo testadas foram: *Lentinus edodes* - Le (CCT -4519); *Phanerochaete chrysosporium* - PC (CCT -1999); *Pycnoporus sanguineus* - PS (CCT-4518); *Trametes versicolor* - Tve (CCT-4521); *Trametes villosa* - Tvi (CCT-5567). As cepas foram adquiridas pela Fundação André Tosello Campinas.

2.2 CORANTES

Os corantes utilizados para o estudo foram: FD&C Amarelo N° 6 Crepúsculo e FD&C Amarelo N° 5 Tartrazina.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os fungos foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura (ágar batata) por 7 dias. Após este período, foram coletados discos (7 mm de diâmetro) abrangendo todas as regiões da placa: zona periférica, zona de crescimento e zona central/frutificação. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada espécie fúngica. Um total de 40 discos de micélio fúngico foram inoculados em meio líquido.

Os meios líquidos foram constituídos de 1,25 mL de solução-padrão do corante a 1% e 125 mL de água de poço (coletados da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás) em erlenmeyers de 250 mL. O ensaio controle foi realizado com a presença apenas de água de poço e corante. O período médio de tratamento foi de 25 dias sob temperatura ambiente (28 a 30 °C).

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ESPECTROFOTOMETRIA)

a) Lcc (λ 525 nm): foram utilizados de 0,4 a 0,6 mL do extrato bruto ; 0,3 mL a 0,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e 0,1 mL de seringaldazina 1,0

mmol.L⁻¹, solubilizada em etanol. A reação foi acompanhada durante 5 minutos - λ 525nm = 65000 mmol.L⁻¹.cm⁻¹ (SZKLARZ et al, 1989 - modificado).

b) LiP (λ 310 nm): utilizou-se 0,6 mL do extrato bruto ; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 2,0 mmol.L⁻¹ e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mmol.L⁻¹ solubilizada em tampão tartarato de sódio 0,4 mol.L⁻¹ pH 3,0. A reação foi acompanhada durante 5 minutos - λ 310 = 9300 mmol.L⁻¹.cm⁻¹ (TIEN & KIRK, 1984).

c) MnP (λ 610 nm): empregou-se 0,5 ml do extrato bruto ; 0,1 mL de lactato de sódio 0,5 mmol.L⁻¹ ; 0,2 mL de albumina bovina 0,5 % ; 0,05 mL de sulfato de manganês (MnSO₄) 2,0 mmol.L⁻¹ ; 0,05 mL de uma solução de H₂O₂ 2,0 mmol.L⁻¹ solubilizada em tampão succinato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 4,5 e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada em banho-maria a 30°C durante 5 minutos e, após este período, é adicionado 0,04 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 mmol.L⁻¹ para parar a reação. (KUWAHARA et al,1984).

A atividade enzimática da Lcc e da Lic foi expressa em U/mL, onde a unidade U é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto; enquanto a atividade da MnP foi expressa em Abs/ml.min.

2.5 DETERMINAÇÃO DA COR (ESPECTROFOTOMETRIA)

Seguiu-se a diluição de 1:9 (x:y), onde x é o volume em mL coletado do extrato bruto e y o volume em mL de água destilada. Para os ensaios, a concentração dos corantes utilizada foi de 0,01%. Dessa maneira, foi realizada uma diluição com 1,25mL da solução do extrato bruto e 8,75 mL de água destilada. O extrato bruto produzido foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e filtrado à vácuo utilizando membrana de poro 0,45 μ m. O cultivo das espécies fúngicas em meio líquido e a leitura da cor inicial eram realizadas no mesmo dia. A descoloração, assim, foi determinada por meio da redução da absorbância em espectrofotometria de UV-Vis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os discos de micélio fúngico inoculados em meio líquido foram coletados conforme apontado no item 2.3, de forma a diminuir variações entre diferentes cepas de fungos. Assim, o desvio padrão entre os resultados encontrados ficou reduzido e com

maior credibilidade, uma vez que em ensaios utilizando sistemas biológicos, existe a preocupação em controlar as variações inevitáveis entre os inóculos da mesma espécie.

Cada experimento durava, em média, 25 dias, pois após este período não havia mais redução das absorbâncias no espectrofotômetro, estabilizando as taxas de descoloração obtidas pelas espécies fúngicas.

3.1 ENSAIO COM O CORANTE FD & C AMARELO Nº 6 CREPÚSCULO

O ensaio utilizando o corante FD & C Amarelo Nº 6 Crepúsculo foi iniciado com o espectro de absorção em espectrofotômetro para a determinação do melhor comprimento de onda para a quantificação deste analito, que foi estabelecido nas condições deste trabalho em 481 nm.

O cultivo dos fungos em meio líquido foi realizado após uma semana do cultivo em ágar batata, selecionando as cepas que obtiveram maior crescimento sem contaminação.

Ao ser realizado o cultivo das espécies fúngicas nos simulados de efluentes (água de poço + corante), se realizou a leitura da cor inicial com o objetivo de se obter o parâmetro a ser comparado com a leitura dos dias seguintes, verificando a ocorrência de descoloração. A espécie *T. versicolor* foi a que mais se destacou em relação a remoção de cor neste experimento, com 70,63% de descoloração. As demais espécies fúngicas apresentaram uma faixa de descoloração de 10 a 17,12% (Fig. 2).

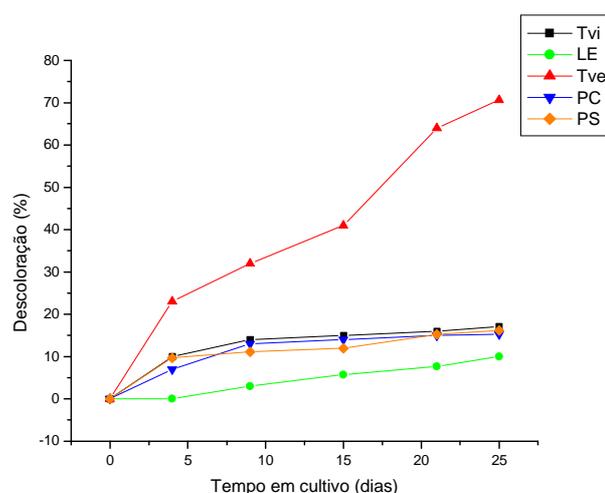


Figura 2 - Descoloração obtida pelas espécies fúngicas no experimento com o corante amarelo crepúsculo.

A avaliação da produção enzimática foi realizada periodicamente, na tentativa de estabelecer conexão entre os períodos de maior descoloração com a de maior atividade enzimática. As atividades enzimáticas obtidas no experimento com o corante amarelo crepúsculo podem ser visualizadas na Figura 3.

A espécie *T. versicolor* apresentou grande produção de Lcc até o 4^a dia de cultivo, com remoção de cor acima de 20%. Entre o 4^o e 11^o dias, houve um pequeno decréscimo de produção de Lcc ao mesmo tempo em que houve menores valores de remoção de cor. Posteriormente, após o 16^o dia, houve uma intensa descoloração acompanhada de grande atividade de Lcc. Assim, estes dois parâmetros ficaram claramente correlacionados entre si. A enzima LiP apenas começou a ser produzida pelo *T. versicolor* após o 9^o dia de cultivo, atingindo altos valores no 17^o dia em diante. Portanto, a considerável descoloração inicial não esteve relacionada com a produção desta enzima, podendo ter influenciado a remoção de cor apenas nos últimos dias de experimento, quando apresentou valores altos de atividade. A enzima MnP apresentou maior atividade para o fungo *T.versicolor* do 15^o (40%) ao 21^o dia (70,63%) de cultivo, podendo estar relacionada com a grande descoloração deste período. Assim, o fungo *Trametes versicolor* caracterizou-se por ser bom produtor de Lcc. (KUNZ et al, 2002). Esta enzima lignolítica tem a capacidade de catalisar reações de desmetilação, que é um inicial e importante passo em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos e ligações Ca - Cb em estruturas fenólicas. Em processos de oxidação de muitos compostos (principalmente de compostos fenólicos), a Lcc apresenta uma grande especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais (PERALTA-ZAMORA et al, 2003).

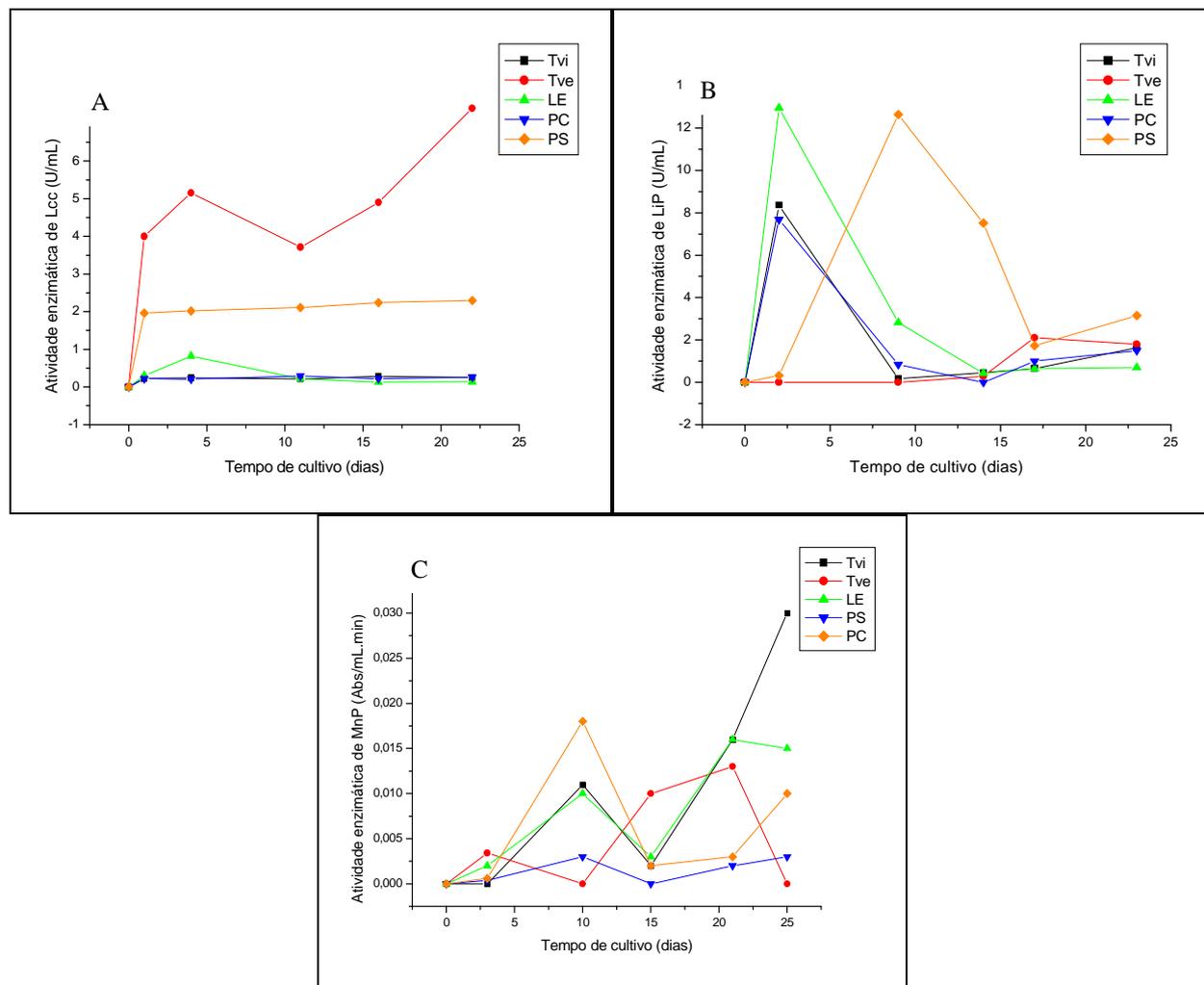


Figura 3 - Produção enzimática dos fungos no ensaio com o corante amarelo crepúsculo: A) Lcc; B) LiP e C) MnP, respectivamente.

Os fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *P. cryosporium* obtiveram taxas de descolorações bem próximas: 17,12%, 16,2% e 15,24%, respectivamente. A espécie *L. edodes* obteve a descoloração mais sutil entre as espécies, pois ao final do experimento apresentou apenas 10% de remoção de cor. A atividade enzimática das espécies estudadas está apresentada na Tabela 1.

Para o fungo *T. villosa*, não houve uma produção significativa de Lcc que se manteve por todo experimento em valores próximos, não acompanhando os aumentos gradativos de remoção de cor. A LiP apresentou uma maior correlação no início do experimento, pois apresentou alta atividade enzimática logo no 2º dia (8,36 U/mL), tendo uma descoloração de 7% já no 4º dia. Porém, depois dessa alta atividade da enzima, seus valores apresentaram uma queda brusca, não acompanhando o período de descoloração considerável entre o 2º e o 9º dia. Em relação ao MnP, não apresentou

grande influência sobre a descoloração, uma vez que sua atividade apresentou grande aumento a partir do 14º dia e a descoloração se manteve quase sem alterações. Yamanaka et al (2008), observou que *T. villosa* produz Lcc através de sua fase de crescimento, em contraste com outros basidiomicetos, onde o sistema ligninolítico é produzido durante o metabolismo secundário. Assim, pode ser fundamentado o fato de o fungo não ter tido uma produção significativa de Lcc.

Em relação ao fungo *P. sanguineus*, a correlação entre a atividade de Lcc e a descoloração ficou bem estabelecida. Durante o tempo total do experimento, houve apenas aumento de produção desta enzima, ocorrendo a mesma situação em relação a descoloração. Ao final de 22 dias, foi obtida a produção enzimática de 2,3 U/mL. Mesma relação também se confirmou com a LiP, pois seu pico de atividade foi ao 9º dia de cultivo, período em que ocorreu maior descoloração. Posteriormente, a remoção de cor continuou ocorrendo de maneira mais discreta, da mesma maneira que houve um grande decréscimo na atividade enzimática. A atividade de MnP foi a mais sutil entre as espécies fúngicas. O fungo *Pycnoporus sanguineus*, basidiomiceto da família *Polyporaceae*, é conhecido por ser um eficiente produtor de Lcc e está sendo utilizado com sucesso na fermentação de resíduos agroindustriais e na descoloração de diferentes corantes (VALERIANO et al, 2009).

Em relação ao *P. cryosporium*, a Lcc apresentou baixa atividade e com pequenas variações durante o teste, não ficando evidente alguma relação definida. A LiP teve o seu pico de atividade (7,68 U/mL) logo no 2º dia de experimento, decaindo bastante nos dias seguintes. Já a MnP, teve boa relação, pois no momento que apresentou seu pico de produção, começou a haver a remoção de cor, após o 4º dia. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas LiP e MnP, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos. Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando sua capacidade de degradar e mineralizar corantes (KUNZ et al, 2002). Spadaro et al (1992) demonstraram que *P. cryosporium* foi capaz de mineralizar alguns azocorantes, sendo a capacidade de descoloração diretamente relacionada com a natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos. Kirby et al (1995), estudando a capacidade de descoloração deste fungo frente a uma amostra de efluente simulada em laboratório, observaram a descoloração total deste após 7 dias de tratamento. Couto et al (2000)

também observaram uma excelente eficiência no tratamento de uma amostra contendo o corante poli-R-478, alcançando descolorações superiores a 95% após o tratamento com o fungo *P. chrysosporium*.

Tabela 1 - Atividade enzimática dos fungos *T. versicolor*, *T. villosa*, *P. sanguineus*, *P. chrysosporium* e *L. edodes* no ensaio com o corante amarelo crepúsculo.

	Dia	<i>T. versicolor</i>	<i>T. villosa</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>L. edodes</i>
Lcc (U/mL)	01	4,0	0,23	0,23	0,22	0,3
	04	5,5	0,24	0,24	0,21	0,82
	11	3,7	0,21	0,21	0,29	0,22
	16	5,0	0,28	0,28	0,22	0,13
	22	7,5	0,25	0,25	0,26	0,14
LiP (U/mL)	02	0	8,36	0,32	7,68	12,95
	09	0,1	0,17	12,64	0,84	2,82
	14	0,25	0,45	7,51	0	0,43
	17	2,3	0,65	1,73	1,0	0,65
	23	1,8	1,63	3,14	1,5	0,7
MnP (Abs/mL.min)	03	0,003	0	0,0004	0,0006	0,002
	10	0	0,011	0,003	0,018	0,01
	15	0,010	0,002	0	0,002	0,003
	21	0,013	0,016	0,002	0,003	0,016
	25	0	0,03	0,003	0,01	0,015

Em relação a espécie *L. edodes*, a maior atividade de Lcc ocorreu ao 4º dia (0,82 U/mL), sendo justamente o período de maior descoloração. Após este tempo, a atividade da enzima começou a cair e a remoção de cor estagnou, com valores bem próximos. Assim, verificou-se a relação da descoloração com a produção enzimática de Lcc. A LiP teve o seu pico de atividade também ao início do experimento. Em relação à MnP, logo no início, até o 10º dia, obteve crescimento da atividade enzimática (0,01 Abs/mL.min), decaindo até o 15º dia (0,003 Abs/mL.min), tendo o seu pico ao 21º dia (0,016 Abs/mL.min). Obici & Peralta (2002), realizaram um estudo utilizando o *L. edodes* para investigar a capacidade dele de descolorir *in vivo* diversos corantes industriais e relacionar a descoloração com a produção de uma ou mais enzimas ligninolíticas. A determinação das atividades das enzimas ligninolíticas LiP, MnP e Lcc nos filtrados das culturas líquidas, mostrou que muito baixos níveis de LiP e Lcc estavam presentes nos

filtrados de culturas. Entretanto, altos níveis de atividade de MnP foram detectados, com máximo de atividade sendo encontrado nas culturas de 10-13 dias, onde a descoloração foi máxima. Tais resultados apresentaram boa correlação com os valores encontrados em nosso estudo, onde a MnP demonstrou estar bem correlacionada com a descoloração obtida.

3.2 ENSAIO COM O CORANTE FD&C AMARELO Nº 5 TARTRAZINA

O corante tartrazina é o mais utilizado na indústria de alimentos e medicamentos (no Brasil, principalmente em antidepressivos), portanto, se justifica o grande número de estudos sobre o mesmo. Assim, neste estudo, o ensaio foi iniciado com a varredura das absorvâncias em espectrofotômetro para a verificação do pico de absorvância do corante, determinando assim o comprimento de onda para a realização de sua leitura em 430 nm.

Para a melhor compreensão das condições de produção enzimática das espécies fúngicas, foi realizado o estudo da atividade enzimática utilizando o corante também na concentração 0,05%.

A análise da atividade enzimática pode ser realizada pela comparação entre os gráficos obtidos nos experimentos do corante nas duas concentrações (Fig. 4).

Em ambas as concentrações, de maneira geral, o padrão da atividade enzimática foram bem semelhantes para as três enzimas. Porém, no experimento de concentração 0,05%, as espécies fúngicas produziram maior quantidade de enzimas. Assim, o corante em concentrações mais elevadas tendem a aumentar a produção enzimática. Gondim et al (2007), realizou um estudo para observar a habilidade de culturas microbianas na remoção do corante Preto de Pirazol em diferentes concentrações (5 a 20 mg/L). Assim, o corante com maiores concentrações obtiveram menores taxas de cor residual, ou seja, as culturas microbianas foram mais eficazes no processo de descoloração com o corante mais concentrado. Provavelmente, quanto maior o estresse que o meio se encontra (menores taxas de O₂, C, N do meio), mais o microrganismo se encontrará em metabolismo secundário e maior será a sua produção enzimática resultando em maiores taxas de descoloração.

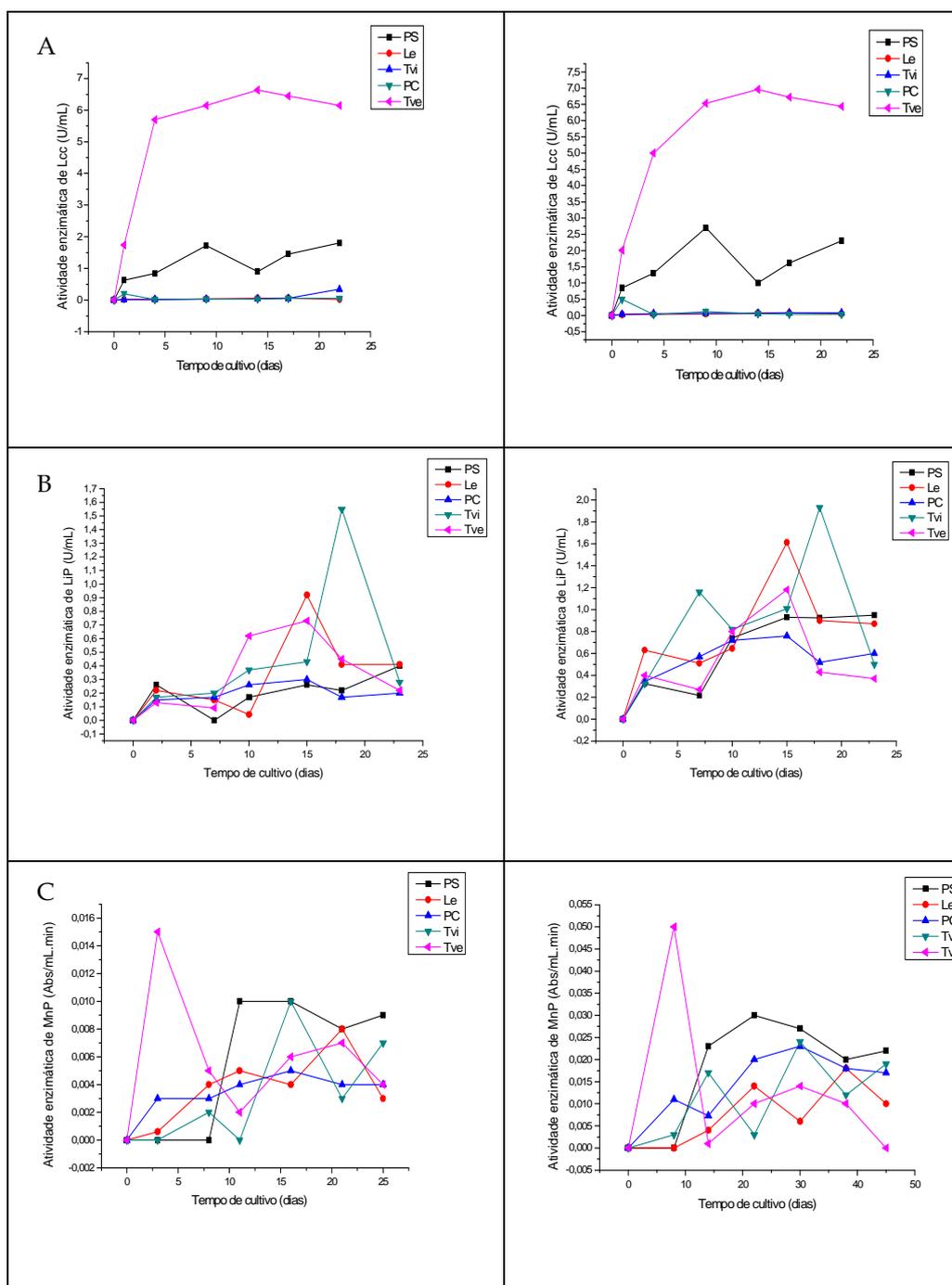


Figura 4 - Comparação entre a produção enzimática atingida pelos fungos com o corante nas concentrações de 0,01% e 0,05%, respectivamente - A) Lcc; B) LiP e C) MnP

A análise da descoloração foi realizada com o corante na concentração 0,01%. Logo no início do experimento, todas as espécies já apresentaram remoção de cor. O fungo *P. crysosporium*, no primeiro dia, apresentou uma descoloração de 5,4%. No entanto, foi após o 5º dia que houve o diferencial de descoloração entre as espécies fúngicas. O *P. crysosporium*, apesar de ter apresentado a maior remoção de cor no início do experimento, não apresentou descoloração nos demais dias e, ao final, foi a espécie que apresentou a descoloração mais sutil. Barbosa & Santiago (2005), em seu estudo sobre a descoloração do corante antraquinona (Ramazol Brilhante Laranja) também

verificaram que o fungo *P. crysosporium* iniciou o processo de descoloração no início do experimento, por volta do 6º dia.

Assim, a espécie *T. versicolor* foi a que mais se destacou (38,45%). Segundo Barbosa & Santiago (2005), o *T. versicolor* e o *T. villosa* apresenta uma descoloração em 9 dias de experimento, o que reafirma nossos resultados. As demais espécies obtiveram uma remoção de cor menos significativa, descolorindo não mais que 10,6%, valor obtido pelo *P. sanguineus* (Fig. 5).

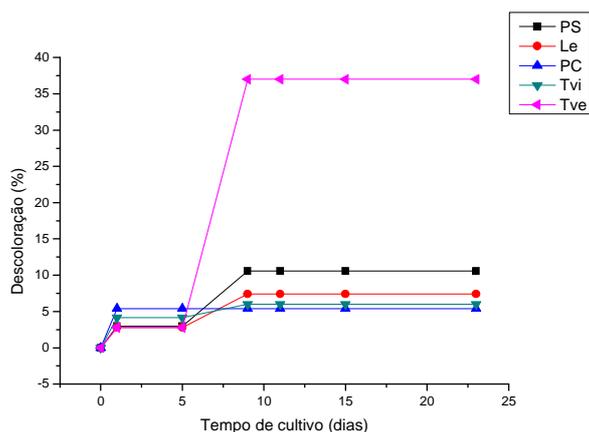


Figura 5 - Descoloração obtida pelos fungos no experimento com o corante amarelo tartrazina.

A análise entre a descoloração e as atividades enzimáticas deve ser discutida para cada espécie fúngica para uma melhor compreensão da relação existente, ou seja, qual enzima se mostrou mais eficaz no processo de remoção de cor em cada caso.

A espécie *T. versicolor*, sendo grande produtora de Lcc produziu 6,63 U/mL em 14 dias. E mais uma vez a relação desta enzima com o processo de descoloração ficou bem evidente. Também produz um pico alto de MnP (0,015 Abs/mL.min) logo no 3º dia de experimento, que pode influenciar a descoloração inicial, principalmente. Já em relação a LiP, seus valores começaram a aumentar por volta do 10º dia, ou seja, quando já não houve mais descoloração, não ficando evidente grande influência. Sousa et al (2009), em seu estudo de descoloração utilizando os corantes FD & C Azul Nº 2 Indigotina, Vermelho Nº 6 Ponceaux 4R e FD & C Amarelo Nº 6, demonstrou que o *T. versicolor* também foi a espécie fúngica que apresentou a melhor capacidade de descolorir, tendo seu maior potencial obtido com o corante azul, onde removeu 93,5% da cor em 9 dias, produzindo 3,6 U/mL de atividade enzimática de Lcc.

O *P. sanguineus*, *L. edodes*, o *T. villosa* e o *P. cryosporium* obtiveram 10,6%, 7,4%, 6% e 5,4% de descoloração, respectivamente. A análise de suas atividades enzimáticas está apresentada na Tabela 2.

O *P. sanguineus* apresentou uma descoloração sutil (10,6%), mas foi o segundo melhor agente descolorante. Embora tenha sido bem menos eficaz que o *T. versicolor* para descolorir o corante amarelo tartrazina, apresentou características semelhantes a ele. Também se apresentou como um bom produtor de Lcc, tendo sua máxima atividade (1,72 U/mL) ao 9º dia de experimento. Valeriano et al (2009), em seu estudo de indutores para a produção de Lcc por *Pycnoporus sanguineus*, encontrou máximos valores de produção de Lcc entre o 7º e 9º dia de experimento, como obtido neste estudo. Também produziu altos níveis de MnP (0,01 Abs/mL.min) ao 11º dia. E quanto a LiP, este fungo não se destacou como produtor desta enzima.

Assim, houve perfeita relação entre os altos valores de atividade enzimática obtidos pelo *T. versicolor* e a alta descoloração gerada pelo mesmo. Enquanto que os valores de atividade enzimática obtidos pelo *P. sanguineus* foram menores (principalmente em relação à Lcc), igualmente foi menor sua descoloração. Esta relação também foi detectada pelo trabalho citado de Sousa et al (2009), onde as espécies *T. versicolor* e *P. sanguineus* produziram 3,6 e 3,3 U/mL de atividade de Lcc e descoloriram 93,5% e 81,5% do corante FD & C Azul N° 2 Indigotina, respectivamente.

Tabela 2. Atividade enzimática dos fungos *T. versicolor*, *P. sanguineus*, *L. edodes*, *T. villosa* e *P. cryosporium* no ensaio com o corante amarelo tartrazina 0,01%.

	Dia	<i>T. versicolor</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>T. villosa</i>	<i>P. cryosporium</i>
Lcc (U/mL)	01	0	0,63	0,015	0,015	0,2
	04	5,7	0,84	0,02	0,02	0,018
	09	6,1	1,72	0,034	0,03	0,037
	14	6,6	0,9	0,05	0,04	0,031
	17	6,5	1,45	0,06	0,05	0,05
	22	6,0	1,8	0,02	0,34	0,05
LiP (U/mL)	02	0	0,26	0,22	0,17	0,15
	07	0,13	0	0,15	0,2	0,17
	10	0,61	0,17	0,043	0,37	0,26
	15	0,72	0,26	0,92	0,43	0,3
	18	0,45	0,22	0,41	1,55	0,17
	23	0,2	0,4	0,41	0,28	0,2
MnP	03	0,015	0	0,0006	0	0,003

(Abs/mL.min)						
	08	0,005	0	0,004	0,002	0,003
	11	0,002	0,01	0,005	0	0,004
	16	0,006	0,01	0,004	0,01	0,005
	21	0,007	0,008	0,008	0,003	0,004
	25	0,004	0,009	0,003	0,007	0,004

Em relação aos outros fungos que não obtiveram considerável remoção de cor, o *T. villosa* destacou-se como grande produtor de LiP, com um pico ao 18º dia no valor de 1,55 U/mL. Também foi bom produtor de MnP, produzindo 0,01 Abs/mL.min ao 16º dia. O fungo *L. edodes* também se destacou como um bom produtor de LiP, tendo sua máxima atividade ao 15º dia (0,92 U/mL). Como produtor da enzima MnP, teve destaque ao 21º dia (0,008 Abs/mL.min). O *P. cryosporium* apresentou uma boa descoloração no início do experimento (5,4% ao 1º dia), período em que a enzima Lcc teve maior atividade enzimática (0,2 U/mL). MnP teve maior atividade ao 16º dia (0,03 Abs/mL.min) e a LiP ao 15º dia (0,3 U/mL). Já em relação à Lcc, nenhum outro fungo se destacou como bom produtor desta enzima, reafirmando a relação entre esta enzima e a descoloração. Os estudos realizados por Yamanaka et al (2008), revelam interferências da composição do meio sobre a produção de enzimas ligninolíticas por *Trametes villosa* CCB176 e reforçam a importância de compreender as necessidades nutricionais de cada espécie para a aplicação biotecnológica de basidiomicetos. Os rendimentos específicos da atividade de Lcc obtida com a adição de cobre mostram a possibilidade de otimizar a produção de Lcc, uma enzima de interesse comercial, através da gestão de um parâmetro de fácil controle, mesmo em escala industrial.

CONCLUSÃO

O fungo *T. versicolor* foi o agente descolorante de maior eficiência neste trabalho, chegando a alcançar uma descoloração de 70,63% no ensaio com o corante FD&C Amarelo Nº 6 Crepúsculo. E como tal fungo caracteriza-se como grande produtor de Lcc, esta foi a enzima que mais teve correlação com o processo de remoção de cor. No ensaio com o corante FD&C Amarelo Nº 5 Tartrazina, também foi o melhor agente descolorante, porém por ser um corante mais resistente a degradação, apresentou 38,45% de descoloração. Assim, principalmente esta espécie fúngica, demonstrou ter

potencial para ser empregada em bioprocessos para remoção de cor de efluentes industriais.

Em relação às demais espécies fúngicas, o fungo *P. sanguineus* apresentou maior destaque por também ser um bom produtor de Lcc e assim ter maior potencial para ser eficaz em processos de remoção de cor. As outras espécies obtiveram apenas descolorações sutis, não havendo nenhuma outra que se mostrou eficaz no processo de remoção de cor nas condições dos experimentos realizados neste estudo.

Dessa maneira, estudos complementares devem ser realizados para melhor entendimento da reação das enzimas ligninolíticas em compostos presentes nos efluentes industriais, a fim de otimizar as condições de maior produção de enzimas ligninolíticas e encontrar o organismo com maior adaptação e capacidade de degradar mais eficazmente estes tipos de resíduos a um custo acessível para a aplicação industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, D. R.; SANTIAGO, M. F. Descoloração do corante antraquinona (remazol brilhante laranja) por fungos de decomposição branca. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**. v. 2, p. 32-33, 2005.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev. bras. otorrinolaringol.** v. 72, n. 3, p. 400-406, 2006.

CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.29, p. 473-477, 2001.

COUTO, S. R. et al. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biores. Technol.** v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, V. S., et al. N-demethylation of methylene Blue by Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Biochemical Biotechnology**. v. 84-86, p. 255-265, 2000.

GOMES, K., et al. Avaliação da presença de corantes azóicos em medicamentos para uso pediátrico comercializados no Brasil. **Com. Ciências Saúde**. v. 18, n.1, p. 51-56, 2007.

GONDIM, A. L. N.; BARBOSA, A. P. A., PAZ, M. C. F. Remoção biológica de corantes têxteis através do consórcio bacteriano entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. In: II CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, João pessoa, 2007. **Anais**. João Pessoa, 2007.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**. v. 23. n. 1, p. 74, 2000.

- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 454-466, 2002.
- KIRBY, N.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolorization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Lett.** v. 17, p. 761-764, 1995.
- KUNZ, A., et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v. 25, n. 01, p. 78-82, 2002.
- KUWAHARA, M., et al. Separation and characterization of two extra cellular H₂O₂ dependent oxidizes from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FBS Lett.** v. 169, p. 247-250, 1984.
- OBICI, L.; PERALTA, R. M. Descoloração in vivo de corantes industriais por *Lentinus edodes*. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Maringá, 2002. **Anais**. Maringá, 2002.
- OHKUMA, M., et al. Lignin degradation and role of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. **Focused on Ecomolecular Science Research**. n. 42, p. 39-42, 2001.
- PERALTA-ZAMORA, P., et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 42, n. 2, p. 131-144, 2003.
- RODRIGUES, S.; FERNÁNDEZ, M.; BERMÚDEZ, R. C. Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus* spp. **Rev. Iberoam Micol.** n. 20, p. 164-168, 2003.
- SOUSA, I. F. F., et al. Estudo da aplicação de fungos de decomposição branca no processo de filtração lenta para a remoção de cor. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Recife, 2009.
- SPADARO, J. T.; GOLD; M. H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, n. 8, p. 2397-2401, 1992.
- SZKLARZ, G. D., et al. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycology**. v. 81, p. 234-240, 1989.
- TIEN, M.; KIRK, K. Lignin degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification Characterization and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂ requiring Oxygenizes. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 81, p. 2280-2284, 1984.
- TOH, C., et al. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 569-575, 2003.
- VALERIANO, V. S., et al. Production of laccase by *Pynoporus sanguineus* using 2,5 - Xylidine and ethanol. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 40, p. 790-794, 2009.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. **Quím. Nova**. v. 29, n. 2, p. 230-233, 2006 .
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 161-167, 2003.
- YAMANAKA, R. et al. Lignolytic enzymes produced by *trametes villosa* ccb176 under different

culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, n. 1, p. 78-84, 2008.