



**SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES COLETADOS E ISOLADOS EM ÁREA DE
MATA ATLÂNTICA-PE, COM ATIVIDADE FENOLOXIDASE E SUA APLICAÇÃO
NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS.**

ELIANA SANTOS DE LYRA MANCILHA

RECIFE-PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA DE MICROBIOLOGIA

**SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES COLETADOS E ISOLADOS EM ÁREA DE
MATA ATLÂNTICA-PE, COM ATIVIDADE FENOLOXIDASE E SUA APLICAÇÃO
NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Ciências Biológicas - Nível Doutorado,
da Universidade Federal de Pernambuco,
para obtenção do título de Doutora em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Microbiologia

Doutoranda: Eliana Santos de Lyra Mancilha

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Queiroz Cavalcanti

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE, PE

2006

Mancilha, Eliana Santos de Lyra

Seleção de Basidiomycetes coletados e isolados em área de Mata Atlântica-PE, com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos / Eliana Santos de Lyra Mancilha.

– Recife : O Autor, 2006.

128 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Microbiologia – Biotecnologia. 2. Basidiomycetes – Aphyllophorales – Fungos degradadores – Corantes sintéticos – Descoloração. 3. Fungos da podridão branca – Atividade fenoloxidase – Biorremediação. I. Título.

**582.284
579.59**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-008**

ATA DE DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL DOUTORADO DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos oito dias do mês de março de dois mil e seis, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de tese apresentada pela doutoranda **Eliana Santos de Lyra Mancilha**, intitulada: "**Seleção de Basidiomycetes coletados e isolados em área de Mata Atlântica – PE, com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos**". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e seis de janeiro de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti** (Orientador), Livre Docência, pela Universidade Federal de Pernambuco, **José Luiz de Lima Filho**, Doutor em Bioquímica, pela Universidade de Saint Andrews, Escócia, **Galba Maria de Campos Takaki**, Doutora em Microbiologia e Imunologia, pela Universidade Federal de São Paulo, **Leonie Asfora Sarubbo**, Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP, **Maria Francisca Simas Teixeira**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Ana Lúcia Figueiredo Porto**, Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP e **Maria da Paz Carvalho da Silva**, Doutora em Química e Carboidratos, pela Universidade de Birmingham, Inglaterra suplentes. A Prof^ª. Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia, Vice-Coordenadora deu início à Sessão para mais uma defesa de tese do Doutorado. Agradeceu a presença de todos, em especial à Banca Examinadora. Em seguida passou a palavra a Prof^ª. Auxiliadora Cavalcanti para presidir os trabalhos, com a palavra, a presidenta convidou a doutoranda para fazer a exposição de sua tese, que efetuou em cinquenta minutos. Continuando, a presidenta solicitou à Banca Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.^a Francisca Teixeira (1º examinador), Dr.^a Leonie Sarubbo (2º examinador), Dr.^a Galba Takaki (3º examinador), Dr. José Luiz Filho (4º examinador), Dr.^a Auxiliadora Cavalcanti (5º examinador). Logo após, a Presidenta teceu agradecimentos, em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim de proceder à avaliação da doutoranda. A Banca Examinadora atribuiu a **Eliana Santos de Lyra Mancilha** a seguinte menção: "**Aprovada**" por unanimidade. Face ao resultado, a mesma está apta a

colar o grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área **Microbiologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 08 de março de 2006.

Adenilda Eugênia de Lima
Leonie Astora Samulho
Chiana Leites de Lages Mendonça
Alessandro E. P. de Alencar
Francisco Braga de Sá

Dedico

As pessoas mais importantes da minha vida

Meus Pais,

José Gabriel (In memorian)

Nidala Santos

Meus Filhos

Ricardo Augusto

Renata Lyra

Matheus Lyra

Meu Esposo

Francisco Júnior

“Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados.

Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades.

Quando lutamos por eles,

nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apóiam

e nos compreendem.

Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias,

tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.

Mas os sonhos, por serem verdadeiros projetos de vida,

resgatam nosso prazer de vida,

que representam a felicidade essencial

que todos procuramos.”

(Augusto Cury, 2004)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela sua presença constante em todos as etapas da minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, especialmente ao Doutorado do Centro de Ciências Biológicas, pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro no decorrer do trabalho.

À Prof^a Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela orientação e ensinamentos que acompanharão sempre a minha vida profissional e pessoal.

À Prof^a Dra. Ana Lúcia de Figueiredo Porto pelas sugestões, paciência e oportunidades de compartilhar de seus conhecimentos.

Ao diretor científico do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Prof^o Dr. José Luís de Lima Filho, pela oportunidade de realização deste trabalho, no setor de Biotecnologia.

À Chefe do Departamento de Micologia Prof^a Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, pelo livre acesso aos seus respectivos laboratórios durante a realização desta pesquisa.

A todos os Professores do Curso do Doutorado em Ciências Biológicas- UFPE pela contribuição para minha formação científica.

Ao Prof^o Dr. Benício Barros Neto pela contribuição científica.

À Prof^a Dra. Maria Menezes pelo incentivo para realização desta pesquisa.

Ao meu esposo e amigo Francisco Braga Júnior pelo valioso apoio e grandiosa ajuda em todos os momentos da realização deste trabalho.

A minha mãe Nidala a quem devo tudo da minha formação.

Aos meus amigos Ana Cristina Silveira e Robson Wagner pelo incentivo e amizade no decorrer desta pesquisa.

As secretárias do Curso do Doutorado Adenilda Eugênia e Liane Souza, pela atenção e amizade no decorrer do curso.

As professoras Keila Aparecida, Luciana Franco e Neide Shinohora pelo apoio e amizade demonstrados no decorrer desta pesquisa.

A pesquisadora Dra. Tatiana Gibertoni pela colaboração na identificação dos fungos coletados.

A todos os colegas do LIKA, em especial a Alessandro Albertini, Daniela Viana, Daniela Bruneca, Tatiana Porto, Taciana Cavalcanti, Isaura Oliveira, Márcia Cunha, Ian Porto, Amanda e Givanildo.

Aos técnicos do LIKA, Moisés Melo e Rafael, pela presteza no atendimento e pela amizade.

E, finalmente, a todos que contribuíram de alguma forma para realização desta pesquisa, muito obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Filo Basidiomycota	22
2.2 Enzimas produzidas por Basidiomycetes	25
2.2.1 As fenoloxidasas	26
2.3 Corantes sintéticos.....	29
2.3.1 Histórico	29
2.3.2 Características químicas	32
2.3.3 Problemas toxicológicos associados aos corantes	36
2.4 Indústria têxtil	37
2.4.1 Tratamentos químicos	38
2.4.2 Tratamentos físicos	39
2.4.3 Tratamentos biológicos	40
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES PARA ATIVIDADE FENOLOXIDASE	
RESUMO	67

1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Coletas.....	70
2.2 Identificação	70
2.3 Isolamento	71
2.4 Seleção dos fungos produtores de fenoloxidase	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Características culturais das espécies	72
3.1.1 <i>Caripia montagnei</i>	72
3.1.2 <i>Datronia caperata</i>	72
3.1.3 <i>Earliella scabrosa</i>	72
3.1.4 <i>Fomitopsis feei</i>	73
3.1.5 <i>Ganoderma stipitatum</i>	73
3.1.6 <i>Hexagonia hydroides</i>	73
3.1.7 <i>Pleurotus ostreatus</i>	73
3.1.8 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	73
3.1.9 <i>Trametes membranacea</i>	74
3.2 Seleção dos fungos produtores de fenoloxidase	74
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
 CAPÍTULO II - DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMYCETES ISOLADOS DE MADEIRAS DA MATA ATLÂNTICA-PE BRASIL.	
Sumário	84
Introdução	85
Materiais & Métodos	87

Corantes	87
Microrganismos	88
Descoloração de corantes sintéticos	88
Determinação da redução de cor.....	88
Resultados & Discussão	89
Conclusões	95
Referências	96
 CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO	
CORANTE ALARANJADO II E PRETO V POR <i>Pycnoporus sanguineus</i> E	
<i>Trametes membranacea</i>	
Resumo.....	102
Introdução.....	103
Materiais e Métodos.....	105
Microrganismos.....	105
Meios de culturas.....	105
Corantes	105
Condições culturais	106
Determinação da redução de cor	106
Análise estatística	107
Resultados e Discussão	109
Referências	115
5. CONCLUSÕES GERAIS	119
ANEXOS	121

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Basidiocarpo de <i>Pycnoporus sanguineus</i> degradando madeira.....	23
Figura 2. Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico	29
Figura 3. Estrutura química da mauveína	30
Figura 4. Estrutura molecular de um corante, onde A é o grupo cromatóforo e B o grupo reativo sulfatoetilsulfona	32
Figura 5. Estrutura química dos corantes azóicos utilizados nos experimentos: a) alaranjado de metila, b) alaranjado II, c) vermelho congo, d) vermelho fenol e c) preto V.....	34
Figura 6. Estrutura química de corantes não azóicos utilizados no experimento: a) azul de bromofenol, b) azul de metileno, c) verde de metila	35

CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENOLOXIDASE

Figura 1. Reação de fenoloxidase em agar malte acrescido de ácido gálico com 10 dias. a) <i>Fomitopsis feei</i> (Reação negativa), b) <i>Hexagonia hydroides</i> , c) <i>Trametes membranacea</i> , d) <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Reação positiva).....	76
--	----

CAPÍTULO II - DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMYCETES ISOLADOS DE MADEIRAS DA MATA ATLÂNTICA-PE-BRASIL

Figura 1. Gráfico dos pesos na 1ª e 2ª componentes principais.	92
Figura 2. Escores dos isolados dos componentes	93

Figura 3. Espectro UV-VIS do corante azul de bromofenol antes (controle) e depois do tratamento (fungos).....	94
---	----

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZO ALARANJADO II E PRETO V POR *Pycnoporus sanguineus* E *Trametes membranacea*

Figura 1. Estrutura química dos corantes utilizados nos experimentos	106
Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos sobre a resposta descoloração no 6º dia de crescimento	111
Figura 3. Gráfico de Pareto dos efeitos sobre a resposta descoloração no 12º dia de crescimento.....	113
Figura 4. Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento (2^{6-2}) no 12º dia de crescimento	114

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Histórico das principais descobertas dos corantes.....	31
---	----

CAPÍTULO I - – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENOLOXIDASE

Tabela 1. Crescimento das espécies submetidas à atividade fenoloxidase através do ácido gálico.	75
---	----

CAPÍTULO II - DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMYCETES ISOLADOS DE MADEIRAS DA MATA ATLÂNTICA-PE-BRASIL

Tabela 1. Características químicas dos corantes utilizados no experimento.....	87
---	----

Tabela 2. Percentual de descoloração dos corantes sintéticos utilizados no experimento	90
---	----

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZO ALARANJADO II E PRETO V POR *Pycnoporus sanguineus* E *Trametes membranacea*

Tabela 1. Características químicas dos corantes utilizados no experimento.....	105
---	-----

Tabela 2. Níveis dos fatores utilizados nos estudos de descoloração dos corantes	107
---	-----

Tabela 3. Condições que foram empregadas nos 16 (2^{6-2}) ensaios de descoloração por fungos	108
---	-----

Tabela 4. Avaliação do percentual de descoloração dos corantes alaranjado II e preto V e biomassa de <i>T. membranacea</i> e <i>P. sanguineus</i>	110
--	-----

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a produção de fenoloxidasas e a capacidade de descoloração de corantes sintéticos utilizados em indústrias têxteis foram utilizados fungos Basidiomycetes coletados em madeiras na Mata do Parque Dois Irmãos-PE. Dentre os fungos coletados foram identificadas as seguintes espécies: *Hexagonia hydroides*, *Pleurotus ostreatus*, *Datronia caperata*, *Ganoderma stiptatum*, *Caripia montagnei*, *Trametes membranacea*, *Pycnoporus sanguineus*, *Earliella scabrosa* e *Fomitopsis feei*. Para detecção da atividade fenoloxidase foi utilizado o meio ágar-malte acrescido de ácido gálico a 0,5% m/V. Todas as espécies, com exceção de *G. stiptatum* e *F. feei*, apresentaram reação enzimática positiva, evidenciada pela presença de halo com coloração marrom no meio após o crescimento dos fungos. Quanto a descoloração de corantes, foi utilizado o meio de KING adicionados de 0,05% m/v dos seguintes corantes: azul de metileno (AM), azul de bromofenol (AB), verde de metila (VM) e vermelho de fenol (VF), vermelho congo (VC), alaranjado de metila (LM). Os corantes AM, LM e AB foram degradados por todos os fungos, tendo este último corante apresentado os melhores resultados com percentual de descoloração de até 99,5% com *Trametes membranacea*. Resultados também significativos foram observados, com *Earliella scabrosa*, 96,52 % e 95,80% e 72 % com *Pycnoporus sanguineus*, para VM, VF e VC, nessa ordem. Foi investigada a descoloração dos corantes Alaranjado II e Preto V por *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea*, aos seis, doze e dezoito dias, através de um planejamento fracionário, com um total de 16 ensaios, estatisticamente representado por 2^{6-2} . Os fungos foram cultivados em frascos de Erlenmayer contendo os meios malte e de King acrescido de 0,05% m/v dos corantes Alaranjado II e Preto V, pH 4,5 e 5,0, na presença ou ausência de agitação e/ou luminosidade. A interação entre as variáveis (meios de cultivo e tipos de corantes; agitação e corantes) apresentaram efeitos significativos. A melhor degradação do

corante alaranjado II ocorreu no meio King, enquanto a degradação do corante Preto V ocorreu mais facilmente no meio Malte. Quanto à agitação dos frascos, a velocidade de rotação de 130 rpm foi a melhor condição para a degradação dos corantes analisados.

Palavras-chaves: Basidiomycetes, fenoloxidasas, corantes sintéticos, biodegradação, descoloração.

ABSTRACT

With the objective of evaluating the phenoloxidase production and the decolorization capacity of synthetic dyes used in the textile industries were used Basidiomycetes fungi collected from wood in the Forest of Dois-Irmãos Park, PE. Among the collected fungi were identified the following species: *Hexagonia hydroides*, *Pleurotus ostreatus*, *Datronia caperata*, *Ganoderma stiptatum*, *Caripia montagnei*, *Trametes membranacea*, *Pycnoporus sanguineus*, *Earliella scabrosa* and *Fomitopsis feei*. For detection of the activity phenoloxidase was used ágar-malts media added of galic acid to 0,5% m/V. All the species, except *G. stiptatum* and *F. feei*, presented positive enzymatic reaction, evidenced by the presence halo with browns coloration in the media after growth of the fungi. As the decolorization of dyes, was used KING's media added of 0,05% m/v of the following dyes: Methylene Blue (MB), Bromophenol Blue (BB), Methyl Green (MG), Phenol Red (PR), Congo Red (CR) and Methyl Orange (MO). The dyes MB, MO e BB were degraded by the all fungi, however this last one presented the best results with percentil of discoloration up to 99,5% with *T. membranacea*. It was also observed with results significant, 96,52 % e 95,80% with *Earliella scabrosa* and 72 % with *P. sanguineus*, for MO, PR e CR, in that order. It was investigated this discoloration of the azo dyes Orange II and Black V by *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes membranacea*, to the six, twelve and eighteen days, through a fractionary planning, with a total of 16 assays, estatisticament represented for 2^{6-2} . The fungos had been cultivated in Erlenmayer flasks contend the malt and King's media increased of 0,05% m/v fo the dyes Orange II and Black V, pH 4.5 and 5.0, in the presence or absence of agitation and/or luminosity. The interaction among the variables (cultivation medias and dyes types; agitation and dyes0 they presented significant effects. The beste decolorization of the Orange II dye

occurred in King's media, while the decolorization of the Black V dye occurred more easily in the malt media. As for the agitation of the flasks, the speed rotation of 130 rpm was the best condition for the decolorization of the dyes analysed.

Key-words: Basidiomycetes, phenoloxidases, synthetic dyes, biodegradation, decolorization.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O problema da poluição ambiental tem caráter mundial. Originou-se na revolução industrial, intensificou-se com a explosão populacional humana e perpassa pelo modelo sócio-econômico-cultural. Em muitas regiões brasileiras que abrigam pólos industriais e densa população, o ecossistema aquático vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos industriais (BALAN, 2002). Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos anualmente em todo planeta. Deste montante, cerca de 20% dos corantes são descartados em efluentes durante o beneficiamento têxtil (ZANONI; CARNEIRO, 2001). A remoção ou degradação desses compostos é um dos grandes problemas ambientais enfrentado pelas indústrias têxteis. Devido a estas implicações ambientais e o aumento de leis ambientais mais rígidas, novas tecnologias têm sido investigadas para degradação ou imobilização de compostos em efluentes (KUNZ *et al.* 2002).

Os dejetos industriais são tóxicos à vida aquática e reduzem a transparência da água, afetando o processo de fotossíntese e diminuindo a concentração de oxigênio dissolvido na água (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Além disso, alteram o pH, a solubilidade, teor de sólidos, o odor, a cor e a vazão das águas continentais (BALAN, 2002). De acordo com Wang *et al.* (2005), os corantes podem ser genotóxico e citotóxico, induzindo a mutagenicidade em células T de humanos.

A remoção dos poluentes orgânicos é um dos grandes problemas ambientais enfrentados pelo setor industrial. Várias técnicas têm sido empregadas para o tratamento desses efluentes, dentre elas estão os métodos físicos e químicos. Como exemplos, citam-se a neutralização, degradação química, destruição eletroquímica, fotoquímico, eletrólise,

ionização, ozonização, adsorção, sedimentação, floculação, coagulação, incineração, irradiação, troca iônica (AL-DEGS *et al.* 2000; WILBERG *et al.* 2000; MESHKO *et al.* 2001; TSAI *et al.* 2001; ZANONI; CARNEIRO, 2001; SAUER, 2002; FORGACS *et al.* 2004; TWARDOKUS, 2004). Entretanto esses processos são onerosos, produzem muito resíduos, e são pouco eficientes (AZMI *et al.* 1998). Em face disso, os processos biológicos surgem como alternativas promissoras, por serem de baixos custos e os produtos e subprodutos formados da completa mineralização não agredem o meio ambiente (STOLZ, 2001).

A degradação biológica ou biodegradação é uma alternativa promissora usada para descoloração e mineralização dos corantes. Os principais métodos biológicos utilizados nas indústrias têxteis são: lagoa de estabilização, degradação aeróbia e anaeróbica (SLOKAR; MARECHAL, 1998; AZMI *et al.* 1998). Para o tratamento de um dado efluente, a combinação de tratamentos (físico, químicos e biológicos) pode ser utilizada de maneira complementar, de tal forma que possa suprir as deficiências dos métodos quando aplicados isoladamente (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). Diferentes tipos de organismos, tais como: bactérias, algas, leveduras e fungos filamentosos e, mais recentemente, o consórcio de microrganismos têm sido utilizados para degradar diferentes tipos de corantes (BALAN, 2002).

A utilização de fungos, especialmente os basidiomicetos, no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (SILVA; ESPÓSITO, 2004), tais como a lignina peroxidase (Lip), manganês peroxidase (MnP), cloroperoxidase (CPO), peroxidase de rabanete (HRP) e a lacase. Estas enzimas atuam sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (KARAM; NICELL, 1997).

Resultados sobre micorremediação, utilizando *Dichomitus squalens* (PERIÉ *et al.* 1998), *Lentinula edodes* (BOER *et al.* 2002), *Phanerochaete crhysosporium* (SHEN; GOLD, 1997; MIELGO *et al.* 2002; MARTINS *et al.* 2002), *Pleurotus ostreatus* (HOU *et al.* 2003; POZDNYAKOVA *et al.* 2004), *Pleurotus sajor-caju* (KAMIDA; DURAN, 2002), *Pycnoporus sanguineus* (ESPÓSITO *et al.* 1993), *Trametes versicolor* (LORENZO *et al.* 2002), são promissores. 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; ESPÓSITO, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fenoloxidasas e a capacidade de descoloração de corantes sintéticos utilizados nas indústrias têxteis por fungos Basidiomycetes coletados em madeiras na Mata Atlântica do Parque Dois Irmãos-PE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filo Basidiomycota

Os fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota caracterizam-se por produzirem basidiosporos, em estruturas especializadas, denominadas basídios. Com base nos caracteres morfológicos e na sequência de DNAr, os Basidiomycetes constam de três classes: Hymenomycetes onde estão inseridas as ordens Agaricales e Aphyllophorales, Ustilaginomycetes e Urediniomycetes (ALEXOPOULOS *et al.* 1996).

Segundo Donk (1964) e Hawksworth *et al.* (1995), a ordem Aphyllophorales é caracterizada pela presença de holobasídios em himênio bem definido. O basidiocarpo, também chamado de basidioma, carpóforo, corpo de frutificação, himenóforo ou esporóforo, apresenta coloração, consistência e morfologia variadas. A coloração do basidiocarpo pode variar de branco a marrom escuro, passando por tonalidades amareladas, ferrugíneas ou vináceas. Quanto à consistência, o basidiocarpo pode ser esponjoso, carnoso, papiráceo, coriáceo, suberoso ou lenhoso. Em relação à morfologia, o basidiocarpo pode ser ressupinado (encontra-se totalmente aderido ao substrato), efuso-reflexo (parte está aderida ao substrato e a outra se projeta na borda, formando o píleo) ou pileado (com ou sem estipe).

A ordem Aphyllophorales (Figura 1) é o grupo mais importante deste filo, com cerca de 1200 espécies descritas (ALEXOPOULOS *et al.* 1996). Estudos realizados por alguns autores têm demonstrado a importância desta ordem como fitopatógenos (STALPERS; LOERAKKER, 1982), nematófagos (TZEAN; LIOU, 1993), inibidores de térmitas (GRACE *et al.* 1992) e, também, como comestíveis (PEGLER; SPOONER, 1992) e medicinais

(WALDER *et al.* 1995a; WALDER *et al.* 1995b). Contudo, a principal importância dos membros de Aphyllophorales é sua ação decompositora, principalmente na degradação da celulose e lignina (ALEXOPOULOS *et al.* 1996).



Figura 1. Basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* degradando madeira.

A ordem Agaricales tem sido bastante estudada, compreende 300 gêneros e aproximadamente 5.000 espécies. São comumente conhecidos como cogumelos. O basidiocarpo dos agáricos são tipicamente carnudos, com estipe, píleo e lamelas, onde são produzidos os basidiosporos. (ALEXOPOULOS *et al.* 1996).

Os Agaricales são de grande importância por apresentar propriedades nutricionais (SCHMIDT *et al.* 2003; ZANOTTI-CAVAZZONI, 2000), anti-neoplásicas (VERÇOSA JÚNIOR *et al.* 2004), antimicrobianas (ROSA *et al.* 2003), farmacêuticas (LEITE *et al.* 2003), alucinógenas, micorrízicas, sapróbicas, parasíticas, simbiontes (ALEXOPOULOS *et*

al. 1996; OHKUMA, *et al.* 2001) e, ainda, podem ser usados no tratamento de efluentes industriais (SANTOS *et al.* 2002; KAMIDA; DURRANT, 2005).

Embora existam Agaricales, os representantes da ordem Aphyllophorales são os principais causadores de podridão de madeira, especialmente os pertencentes às famílias Polyporaceae, Corticiaceae e Hymenochaetaceae (GILBERTSON, 1980). O processo de degradação da madeira pelo microrganismo é extremamente variável e dependente do organismo degradador e do micro habitat (ALEXOPOULOS *et al.* 1996). A degradação por Basidiomycetes pode ser do tipo podridão branca ou podridão marrom (parda). Vários grupos de fungos da podridão branca e marrom podem ser facilmente identificados por suas características morfológicas, entretanto em alguns casos se faz necessário o uso das características fisiológicas (KÄRRIK, 1965).

Segundo Tuor *et al.* (1995) os fungos da podridão branca são classificados em cinco grupos: grupo I – os que expressam Lignina Peroxidase (LiP) , Manganês Peroxidase (MnP) e lacase; grupo II – os que produzem MnP e lacase; grupo III – produzem LiP e uma outra fenoloxidase que geralmente é a lacase; grupo IV – secretam apenas LiP e o grupo V no qual estão inseridos aqueles que não foram completamente caracterizados.

O grupo de fungos da decomposição parda degrada principalmente os polissacarídeos enquanto os da decomposição branca degradam todos os componentes lignocelulósicos incluindo a lignina. Os materiais lignocelulósicos adquirem uma aparência esbranquiçada quando decomposto por fungos da podridão branca, quebrando-se facilmente no sentido transversal ao das fibras vegetais enquanto os decomposto por fungos da podridão parda adquirem uma aparência marrom que quebra facilmente em cubos, no sentido transversal ao das fibras vegetais (FERRAZ, 2004).

2.2 Enzimas produzidas por Basidiomycetes

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando os fungos Basidiomycetes baseiam-se nos seus produtos metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. Dentro dessa classe, destaca-se a ordem Aphyllophorales pela sua atividade sapróbica ou degradadora, particularmente, da lignina e celulose (ALEXOPOULOS *et al.* 1996).

A importância do complexo enzimático desses fungos está diretamente relacionada com a degradação de uma ampla variedade de poluentes orgânicos, devido as suas enzimas degradadoras de constituintes da madeira (LEONOWICZ *et al.*, 1999; JOHANSSON; NYMAN, 1993). A completa degradação da lignina é um processo oxidativo que tem sido executado com eficiência pelos Basidiomycetes, tais como *Phanerochaete crhysosporium* (SHENG; GOLD, 1997; TATARKO; BUMPUS, 1998; OLLIKKA *et al.* 1993), *Phlebia radiata* (KANTEINEN *et al.* 1989), *Lentinula edodes* (BOER *et al.* 2002), entre outros.

Segundo Kerem *et al.* (1997), os fungos da podridão marrom são os únicos capazes de deteriorar a madeira pela degradação seletiva da celulose. O material resultante desse processo de degradação pode ser utilizado como fertilizante de solo uma vez que é rico em nutrientes e serve como forragem para ruminantes.

Esses organismos contribuem também na biotransformação de herbicidas (BERGER, 1998), branqueamento de polpa (CAROLINA *et al.* 1998); degradação de explosivos (STAHL; AUST, 1993) devido ao seu sistema enzimático que pode atuar em substratos insolúveis, poluentes orgânicos, na degradação de lignina até a sua redução a concentrações mínimas, produzindo CO₂ e H₂O.

2.2.1 As fenoloxidasas

O uso de enzimas para o tratamento e remoção de poluentes ambientais e industriais tem atraído à atenção de vários pesquisadores devido à alta eficiência, seletividade e por suas reações ambientalmente amigáveis. Dentre as enzimas estudadas com este propósito, o grupo das fenoloxidasas, tais como as lacases, tirosinases e peroxidases têm sido avaliadas por removerem compostos fenólicos e xenobióticos (WINTER; ZIMMERMANN, 1992; IKEHATA, 2004).

Segundo Ferraz (2004) as enzimas envolvidas na degradação de lignina podem ser agrupadas em, pelo menos, duas classes distintas: as fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. As fenoloxidasas compreendem um grupo de enzimas característico por pertencerem as metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, ainda podem ser divididas em dois subgrupos: um contendo as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidase, as quais estão envolvidas na biodegradação da lignina; o outro grupo contém as lacases (enzimas cuproproteínas que não dependem de peróxido para atuar). As enzimas que produzem peróxido são acessórias às peroxidases.

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) incluem um grupo de enzimas, hemeoproteínas, que catalisam reações de oxi-redução usando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como acceptor de elétrons para catalisação de diferentes reações oxidativas (ANNI; YONETANI, 1992; KARAM; NICELL, 1997; DURÁN; ESPÓSITO, 2000). As peroxidases são oxidoreductases produzidas por uma grande variedade de microrganismos (BARRETO *et al.* 2000; RIBEIRO *et al.* 2004; ASSIS *et al.* 2005) e plantas (ROSSI; LIMA, 2001; CAMPOS *et al.* 2004; GOMES *et al.* 2005).

De acordo com Durán; Espósito (2000) e Ikehata *et al.* (2004), a peroxidase de rabanete (HRP), lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e a cloroperoxidase

(CPO) têm sido bastante utilizadas em processos de biorremediação, principalmente no tratamento de resíduos industriais.

Dentre as peroxidases, as LiP's (EC 1.11.1.14, diarilpropano peroxidase, diarilpropane oxygenase, ligninase I), estão entre as mais conhecidas, especialmente aquelas provenientes de *Phanerochaete chrysosporium* (OLIKKA *et al.* 1993; SHENG; GOLD, 1997; TATARKO; BUMPUS, 1998; MARTINS *et al.* 2002). Outros fungos, como *Pycnoporus sanguineus* (ESPÓSITO *et al.*, 1993), *Cerioporiopsis subvermispora* (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004), *Phlebia radiata* (KANTEINEN *et al.* 1989), *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonaris* (RODRÍGUEZ *et al.* 2004), *P. sajor-caju* (KAMIDA; DURRANT, 2005), *Trametes versicolor* (JONG *et al.* 1992; JOHANSSON; NYMAN, 1993) já despertaram o interesse dos cientistas devido a capacidade da LiP em mineralizar compostos aromáticos.

Karam; Nicell (1997) demonstraram que as ligninas peroxidases mineralizam uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes e que oxidam certo número de compostos aromáticos policíclicos e fenólicos.

A MnP (EC 1.11.1.13, peroxidase dependente de Mn) catalisa a oxidação de vários corantes e compostos fenólicos, entretanto essas reações dependem de altas concentrações de magnésio bivalente e de certos tipos de tampões Karam; Nicell (1997). Apesar dessa limitação, vários trabalhos têm ressaltado a importância da aplicação dessa enzima no tratamento de efluentes (JOHANSSON; NYMAN, 1993, CLEMENTE *et al.* 2001; SOUZA SILVA *et al.* 2004; KAMIDA *et al.* 2005).

Kim *et al.* (2003) estudaram através do método eletroenzimático, a capacidade da peroxidase HRP em degradar o corante alaranjado II. Os resultados destes autores demonstraram que a redução do alaranjado II formava subprodutos menos poluentes (amina aromático, ácidos sulfanílico) e outros compostos intermediários.

A cloroperoxidase (EC 1.11.1.10) é uma enzima versátil que pode atravessar os limites catalíticos de outras hemoproteínas oxidativas e pode executar funções múltiplas. Ao contrário de outras peroxidases, a CPO além de catalisar as clássicas reações peroxidativas, também atua como citocromo P450 (YI *et al.* 1999).

A CPO do fungo *Caldariomyces fumago* tem sido relatada na oxidação de compostos fenólicos (La Rotta; Bon, 2002) e no processo de cristalização (AYALA *et al.*, 2002). Preobrazhenskaya *et al.* (2001) estudaram o processo de imobilização desta enzima, da bactéria *Serratia marcescens* W250, em gel de cálcio.

As lacases (EC 1.10.3.2, *p*-difenol, O₂ oxidoreductase, *p*-difenoloxidasas) são enzimas que necessitam de cobre para catalisar a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos reduzindo o oxigênio a água (THURSTON, 1994; CLAUS, 2004). Essas enzimas têm sido estudadas enfocando a sua aplicabilidade industrial, principalmente na sua capacidade em degradar compostos xenobióticos e corantes têxteis (PERRIÉ *et al.* 1998; ABADULLA *et al.* 2000; VASCONCELOS *et al.* 2000; WESENBERG *et al.* 2003; COUTO *et al.* 2004; RODRÍGUEZ *et al.* 2004). Segundo Ferraz (2004) as lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas por meio da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu⁺² a Cu⁺¹, que, por sua vez, reduz oxigênio a água, permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 1)

As tirosinases (EC 1.14.18.1, polifenoloxidasas, catecolase ou catecol oxidase, cresolase ou fenolase) são enzimas que promovem a hidroxilação de monofenóis a o-difenol (a atividade hidroxilase da enzima) e de o-difenol a o-quinona (a atividade difenolase da enzima) (LEATHAM; STAHMANN, 1981; ROSATTO *et al.* 2001; LUPETTI *et al.* 2003).

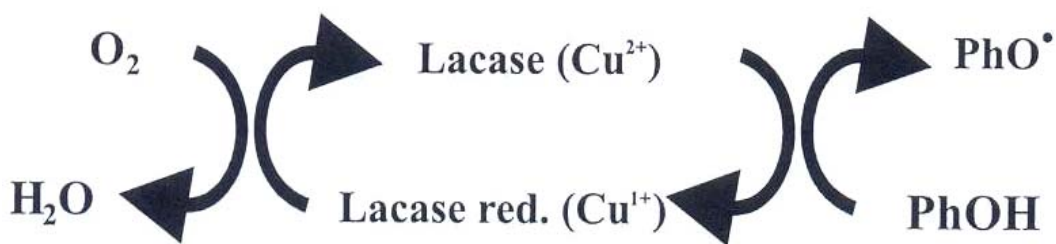


Figura 2. Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. Fonte: Ferraz (2004)

As vantagens potenciais do tratamento enzimático quando comparado com tratamentos convencionais incluem: a aplicação em poluentes recalcitrantes, operação de altas e baixas concentrações de contaminantes em uma ampla variação de pH, uma gama de temperatura e salinidade e a facilidade no controle do processo. (DURAN; ESPÓSITO, 2000). O aumento da vida útil das enzimas, com a concomitante redução de custos do tratamento, tem sido obtido por meio de processos de imobilização. Essa técnica permite que a enzima se associe química ou fisicamente a um suporte biologicamente inerte (SILVA; ESPOSITO, 2004)

2.3 Corantes Sintéticos

2.3.1 Histórico

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C. Até a metade do século XIX, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais, cujas fórmulas de extração e aplicação eram guardadas secretamente. A grande

revolução na história desses compostos ocorreu quando o químico inglês William Henry Perkin sintetizou, em 1856, o primeiro corante sintético – a mauveína (Figura 3), derivado do coque (subproduto do petróleo bruto). Foi o primeiro passo para a produção de corantes orgânicos sintéticos em grande escala (ZANONI; CARNEIRO, 2001). Entretanto, muitos corantes naturais, como o índigo, a alizarina e a henna, utilizados na antiguidade ainda são empregados, e em larga escala (MINATTI, 2005).

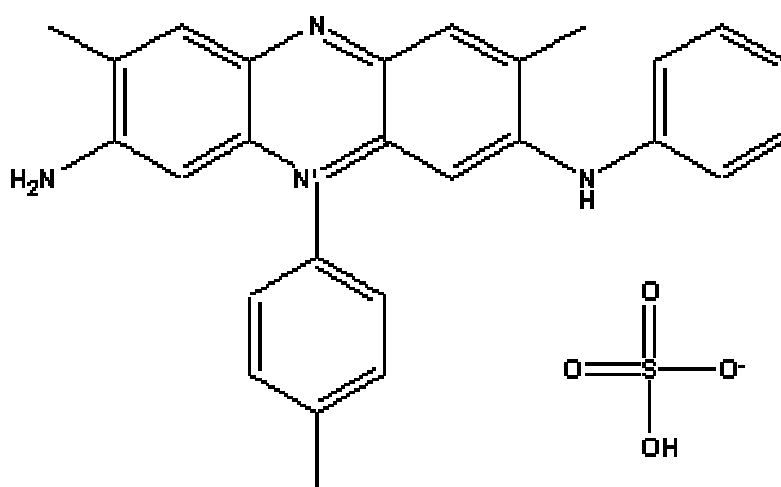


Figura 3. Estrutura química da mauveína. Fonte: Zanoni; Carneiro (2001).

A seguir são sumarizados, na Tabela 1, os principais eventos ocorridos deste a síntese do primeiro corante.

Tabela 1. Histórico das principais descobertas dos corantes.

Ano	Corantes	Referências
1856	Mauveína (Mauve)	William Henry Perkin
1858	Diazotisation de fibras	Griess
1859	Magenta (fucsina)	Verguin
1861	Metil violeta	Lauth
1862	Marrom de Bismarck	Martius e Lightfoot.
1863	Anilina preta.	Lightfoot
1873	1ª tintura de enxofre, um marrom,	Groissant e Bretonniere.
1876	Azul de metileno	Caro e Witt
1880	Crisoidina, primeiro Corante azo.	Thomas e Robert Holliday
1880	Síntese do índigo	Karl Heumann
1884	Vermelho congo	Bottiger
1901	Flanthrene	Bohn
1924	Indigosol O	Baeyer and Sunder
1956	Corantes reativos: Procion	ICI
1970	Cibacron F	Fabricante CIBA-Geigy

Fonte: (Salem, 2000; Druding, 2005).

2.3.2 Características químicas

De acordo com Zanoni; Carneiro (2001), os corantes apresentam estruturas moleculares complexas que podem envolver até 500 reações. Geralmente apresentam um grupo cromóforo (nitro, nitroso, azo e carbonila responsáveis pela cor) e grupos auxiliares (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, ente outros que modificam e/ou intensificam a cor das tinturas) que propiciam sua afinidade pela fibra têxtil, natural ou sintética (Figura 4).

Os corantes são classificados por sua estrutura química ou pela aplicação a que se destinam. Com base na estrutura química podem ser classificados em nitrofenol, nitrosofenol, azo, trifenilmetano, antraquinona, ftalocianina, vinilsulfônico, pirimidina e triazina, por aplicação ele é classificado de acordo com o tipo de fibra a ser corada (TWARDOKUS, 2004). Segundo Forgacs *et al.* (2004), as classes químicas de corantes mais empregados com frequência na escala industrial são os azos, antraquinonas, sulfônicos, indigóides, trifenilmetano (tritol) e derivados de ftalocianina.

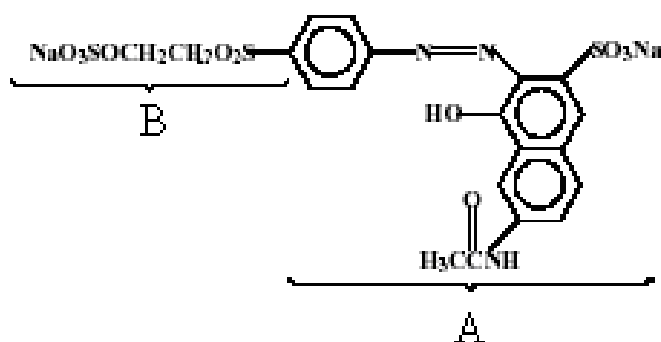


Figura 4. Estrutura molecular de um corante, onde A é o grupo cromóforo e B o grupo reativo sulfatoetilsulfona.

Os corantes azóicos constituem o maior e mais variado grupo de corantes sintéticos orgânicos usados atualmente. Em comum, eles contêm o grupo -N=N-, chamado azo, podendo ser dividido em mono, di e triazo. (KONSTATINOU; ALBANIS, 2004; MINATTI, 2005).

O alaranjado de metila ou ácido laranja 52, é um corante orgânico usado como um indicador ácido-base. Muda de vermelho (pH abaixo de 3,1) a amarelo (pH acima de 4,4) a 25°C e é usado para titulações envolvendo bases fracas. Foi utilizado por Cardoso *et al.* (2005) como inibidor de corrosão de materiais metálicos (Figura 5a).

O alaranjado II (C.I 15.510), 4-[(2-hydroxy-1-naphthyl) azo], ácido benzenosulfônico, p-sulfobenzeno-azo-β-naftol; ácido de laranja A; alaranjado de β-naftol, pertence ao grupo dos corantes monoazos (Figura 5b). Mielgo *et al.* (2001) utilizaram *Phanerochaete chrysosporium* para degradar o alaranjado II, correlacionando a atividade da MnP com sua descoloração.

O vermelho congo (Figura 5c), de sinônimas: ácido naftalenosulfônico, 4-amino-sal de sódio, é preparado tetrazotizando a benzidina e copulando com naftionato de sódio. É uma tintura ácida usada para diagnosticar reações amilóides em tecidos animais (KHURANA *et al.*, 2001; KIM *et al.* 2003).

Vermelho de fenol ou fenolsulfonaftaleína é um indicador de pH que exibe uma transição do amarelo para o vermelho quando ocorre a variação do pH de 6,6 para 8,0 (Figura 5d). Várias pesquisas têm relatado a eficiência dos Basidiomycetes em degradar o corante vermelho de fenol, destacando-se *Coriolopsis rigida* (SAPARRAT *et al.*, 2002), *Pleurotus pulmonarius* (BÖCKLE *et al.* 1999), *Trametes versicolor* (LORENZO *et al.* 2002).

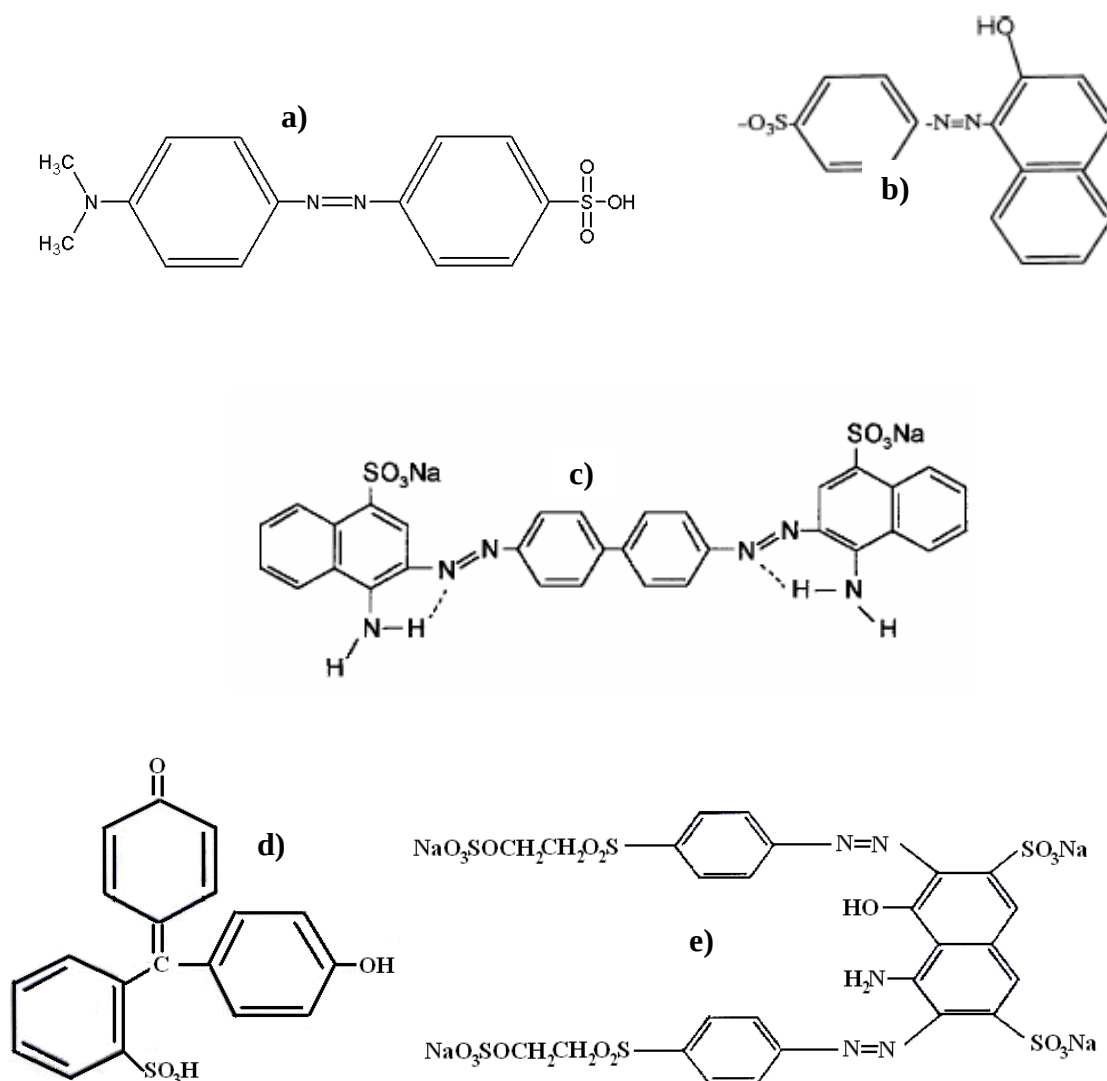


Figura 5. Estrutura química dos corantes azóicos utilizados nos experimentos: a) alaranjado de metila, b) alaranjado II, c) vermelho congo, d) vermelho fenol e e) preto V.

O reativo preto V, (C.I. 20.505) contém um grupo eletrofílico capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tiois das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas (GUARATINI; ZANONI, 2000). Vários fungos têm demonstrado a habilidade em degradar o corante reativo preto V (Figura 5e), entre eles cita-se: *Geotrichum* sp (MÁXIMO *et al.* 2003), *Pleurotus eryngii* (HEINFLINGI *et al.* 1998) e *Trametes versicolor* (BORCHERT; LIBRA, 2001).

O azul de bromofenol, Figura 6a, é um corante utilizado para estudos citoquímicos de glóbulos sanguíneos de répteis (MOURA *et al.*, 1999) e para monitorar a migração de moléculas em experimentos com fragmentos de DNA (CARDOSO; NEDEL, 2002).

O azul de metileno (C.I. 52.015) também conhecido como cloreto de 3,9 — bis dimetilamino fenazotianio ou cloreto de metiltionina pertence à classe química Tiazina (Figura 6b). É um corante de cristais verde escuro com brilho metálico, sem odor (SIQUEIRA *et al.* 1983). De acordo com O'Neil (2001) esse corante é solúvel em clorofórmio, em água (uma grama se dissolve em cerca de 25 ml de água) e em álcool (uma grama se dissolve em 65ml de álcool) e insolúvel em éter.

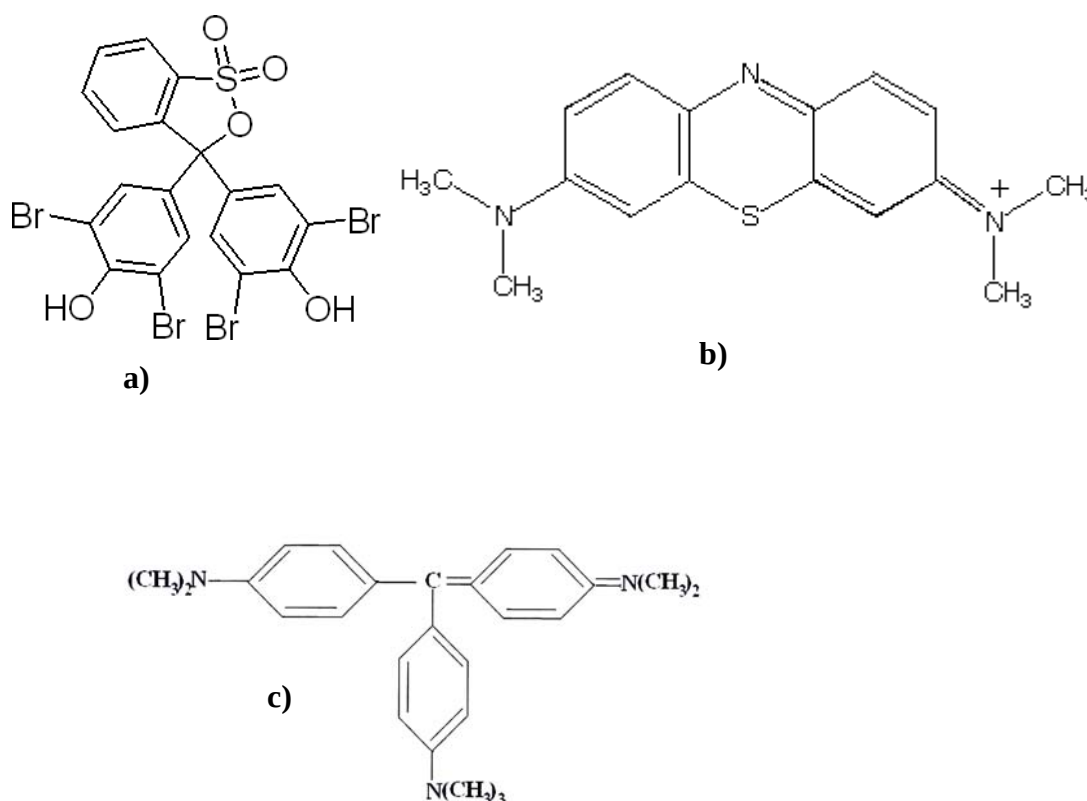


Figura 6. Estrutura química de corantes não azóicos utilizados no experimento: a) azul de bromofenol, b) azul de metileno, c) verde de metila.

Verde de metila (C.I. 42.590, verde brilhante) é um corante básico da classe dos triarilmetano (Figura 6c), sendo bastante usado junto com pironina G como marcador de DNA e RNA (GORGOULIS *et al.* 2005). Fienler; Yildiz (2004) utilizaram o verde metil em seus estudos para determinação de detalhes citológicos de protozoários ciliados. Já Cornaglia *et al.* (1995) o utilizaram como marcador para determinar a atividade de antibióticos orais sobre linhagens de bactéria do gênero *Providencia*.

2.3.3 Problemas toxicológicos associados aos corantes

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes volumosos e complexos (BALAN, 2002). O maior problema no tratamento de efluentes têxteis se deve a presença de corantes oriundos principalmente da etapa de tingimento. Como regra geral, o tingimento divide-se em três etapas, nas quais ocorrem os seguintes processos de natureza físico-química: migração, absorção e difusão/fixação do corante (CPRH, 2001).

A toxicidade é uma propriedade inerente ao agente químico que produz efeitos danosos a um organismo quando a ele exposto, por um tempo, a determinadas concentrações daquele agente (BALAN, 2002), sendo definida em função da quantidade de produtos químicos que são administrados ou absorvidos, pela via de exposição (inalação, ingestão, aplicação tópica, infecção) e sua distribuição no tempo (doses única ou repetida), o tipo de severidade da lesão, o tempo requerido para produzi-la e a natureza do organismo ou organismos afetados (DUFFUS, 1997). Os testes de toxicidade avaliam o efeito do efluente como um todo ou através de substâncias específicas que o compõem; estas abordagens permitem avaliar os efeitos antagônicos ou sinérgicos do corante (BALAN, 2002).

Os rejeitos de indústrias têxteis são tóxicos à vida aquática, diminuem o conteúdo de oxigênio dissolvido e modificam a transparência e solubilidade dos cursos d'água (BALAN, 2002), causando danos as estruturas respiratórias dos organismos aquáticos, além de perturbar seus locais de desova e refúgio (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Em geral, a maioria dos corantes azo não são completamente mineralizados ou degradados. Gnanamani *et al.* (2004) observaram que o tratamento enzimático removeu os grupos cromóforos dos corantes preto 38 e o marrom direto 1 logo após o contato com as enzimas em um pH alcalino. Entretanto a análise espectrofotométrica evidenciaram a liberação de aminas, as quais têm efeitos tóxicos e carcinogênicos em organismos vivos. Wang *et al.*, (2005) também observaram o efeito carcinogênico de corantes industriais em células T humanas.

2.4 Indústria têxtil

Os efluentes têxteis caracterizam-se por serem altamente coloridos, devido à presença de corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento (O'NEILL *et al.* 1999). Infelizmente não se sabe com precisão a quantidade de corantes produzidos no mundo. Estima-se ser mais de 10.000 toneladas por ano. Até o momento, não se sabe também a quantidade de corantes descarregados no ambiente (DESPHANDE, 2001).

Muitos corantes sintéticos e xenobióticos são degradados com dificuldade na natureza a remoção dos resíduos de efluentes de indústrias têxteis tem despertado o interesse de vários pesquisadores preocupados com a qualidade do ambiente na busca de alternativas de descoloração (TIEN; KIRK, 1983; YOUNG; YU, 1997; BORCHERT; LIBRA, 2001; HAMANO *et al.* 2005; SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2005; YU; WEN, 2005).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para tratar resíduos de corantes têxteis, mas todos têm sua especificidade. Cada corante apresenta estrutura e propriedades físico-químicas próprias e envolve diferentes componentes nos processos de tintura, fixação da cor e lavagem final, tornando o efluente uma matriz colorida e altamente complexa (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

2.4.1 Tratamentos químicos

O processo oxidativo é um dos métodos mais comumente usados para a descoloração, devido principalmente à simplicidade de aplicação. O principal agente oxidante é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo ativado a luz ultravioleta. A oxidação química remove o corante do efluente através da oxidação resultando na quebra dos anéis aromáticos das moléculas do corante (SAUER, 2002).

Os métodos de descoloração oxidativa diferem-se pela maneira como o peróxido de hidrogênio é ativado. Por exemplo, no Reagente de Fenton o H_2O_2 é ativado pelo FeII (SLOKAR; LA MARECHAL, 1998). Esta técnica é usada para o tratamento de efluentes que são resistentes aos processos biológicos ou são perigosos para a biomassa viva. Tem se mostrado eficiente na descoloração de corantes solúveis e insolúveis, contudo gera lodo através da floculação do reagente e moléculas do corante (SAUER, 2002).

Segundo Kuntz *et al.* (2002) o tratamento com ozônio, a ozonização, pode ocorrer de forma direta (a molécula de ozônio pode reagir com outras moléculas orgânicas ou inorgânicas via adição eletrolítica) ou indireta (o ozônio pode reagir com o radical OH gerado na decomposição do próprio ozônio). A oxidação por ozônio é capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos. Uma grande

vantagem do ozônio é que ele pode ser aplicado em estado gasoso e não aumenta o volume do efluente e lodo, por outro lado, tem um tempo de meia vida curto, 20 minutos (SAUER, 2002).

Dentre os processos oxidativos, os quais se baseiam na geração de radicais hidroxilas como agente oxidante, a degradação fotocatalítica tem demonstrado excelente eficiência no tratamento de rejeitos industriais (CASTELLAN *et al.*, 1999; SAUER, 2002). Uma grande variedade de compostos orgânicos tóxicos (clorobenzenos, cloroalifáticos, álcoois, fenóis e clorofenóis, herbicidas, surfactantes e corantes como o azul de metileno e o alaranjado de metila) é passível de degradação por fotocátalise heterogênea. Na maioria, a fotodegradação leva à total mineralização dos poluentes gerando CO₂, H₂O e íons do heteroátomo presente (NOGUEIRA; JARDIM, 1998; SANTANA *et al.* 2003). O poder bactericida, da fotocátalise TiO₂, foi observado por Ferreira; Daniel (2004), através da inativação de microrganismos indicadores de contaminação fecal (coliformes totais, *E. coli*, *Clostridium perfringens* e colifagos).

A degradação eletroquímica surge como um método efetivo para remoção de corantes. Há pouco consumo de produtos químicos e não há produção de lodo. Apresenta eficiência e economia na remoção de corantes e uma alta eficiência para remoção de cor e degradação de poluentes recalcitrantes (SAUER, 2002), entretanto, esta técnica não tem sido muito aplicada (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

2.4.2 Tratamentos físicos

Vários métodos têm sido empregados para descoloração das águas de rejeito, dentre ele citam-se: adsorção, precipitação, floculação, sedimentação, coagulação, osmose

reversa, incineração e ionização por radiação (AZMI *et al.* 1998; KUNTZ *et al.* 2002; ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A adsorção tem sido um dos processos físicos mais utilizados no tratamento de efluentes e corantes têxteis. Nesse processo ocorre à transferência de massa do tipo sólido-fluido na qual se explora a propriedade de certos sólidos em concentrar na sua superfície soluções líquidas ou gasosas, permitindo separá-las dos demais componentes dessas soluções (LEAL, 2003). Este processo remove uma ampla variedade de corantes, entretanto o custo de manutenção é elevado (SAUER, 2002).

Os processos de tratamento de efluentes por adsorção tem se baseado na remoção do corante através da passagem da amostra em carvão ativado (MUSSATTO; ROBERTO, 2004; FUNGARO *et al.* 2005; MARCHETTO *et al.* 2005), sílica gel (LAZARIN *et al.*, 2002), trocas iônicas (FONSECA *et al.* 2005), entre outros. Pesquisas têm sido feitas utilizando adsorventes alternativos como a quitosana (KIMURA *et al.* 1999), o bagaço de cana-de-açúcar (CHANDRAN *et al.* 2002), a casca de eucalipto (AMARANTE JÚNIOR *et al.* 2002) e o mesocarpo do coco verde (LEAL, 2003).

2.4.3 Tratamentos biológicos

Os métodos biológicos possuem várias vantagens sob os métodos físicos e químicos, tais como a mineralização, isto é, a conversão de moléculas orgânicas na forma de compostos tóxicos, em biomassa celular e em produtos de catabolismos, como o dióxido de carbono e água (SILVA; ESPÓSITO, 2004), menor custo e os produtos e subprodutos formados são menos tóxicos ao meio ambiente (STOLZ, 2001). Dentre esses métodos, citam-se os tanques de estabilização, lagoas de aeração, lodos ativados, digestão anaeróbica (AZMI

et al., 1998), biosorção (AKSU, 2005) e o consórcio de microrganismos. Trabalhos têm sido relatados apontando a biodegradação por enzimas de fungos ou bactérias como técnicas promissoras para remoção e/ou degradação de efluentes têxteis (ZANONI; CARNEIRO, 2001; AZMI *et al.*, 1998).

A descoloração biológica de corantes sintéticos tem sido amplamente estudada por pesquisadores em todo mundo (CHANG *et al.*, 2001; HU, 2001; KALYUZHNYI; SKLYAR, 2001). Sani e Banerjee (1999) relataram à descoloração de corantes do grupo trifenilmetano por linhagens de *Kurthia* sp. Os corantes foram degradados em curto período de tempo, 30 horas, obtendo os seguintes níveis de descoloração: pararosaniline e verde brilhante (100%), cristal de violeta e verde malaquita (96%), magenta (92%) e violeta de etila (8%). Sob condições anaeróbicas, estes sistemas podem alcançar remoção total da cor do efluente em um curto tempo de exposição. Entretanto, a funcionalidade e eficiência desses sistemas ficam comprometidas sob condição aeróbica, além de produzir compostos recalcitrantes, tais como aminas aromáticas, que são prejudiciais à vida aquática e possuem efeitos cancerígenos e genotóxicos sobre células humanas (GOTTLIEB *et al.* 2002; PINHEIROS *et al.* 2004; WANG *et al.* 2005).

A capacidade dos fungos adaptarem rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para a sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica deve-se a produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, não específicas, capazes de degradar uma série de compostos, inclusive corantes sintéticos. Graças a essas enzimas com grande capacidade catalíticas e o fato de possuírem hifas que penetram no substrato, alcançando mais facilmente os poluentes, os fungos se apresentam como alternativas nos processos de biorremediação (SILVA; ESPOSITO, 2004). Estudos têm comprovado a grande versatilidade fisiológica dos fungos para degradar vários compostos

xenobióticos, incluindo os corantes sintéticos (HARAZONO; NAKAMURA, 2005; RIGAS; DRITSA, 2005)

Dentre os fungos, destacam-se os Basidiomycetes da podridão branca. A eficiência desses fungos está diretamente relacionada à capacidade em degradar lignina. Enzimas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase podem atuar sobre poluentes recalcitrantes específico, facilitando o tratamento final do rejeito industrial (DURÁN, 2004).

Os fungos da podridão branca têm sido intensamente empregados nos processos de biodescoloração de corantes sintéticos. Muitos Basidiomycetes da podridão branca, tais como *Bjerkandera* sp., *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* tem demonstrado excelentes resultados na degradação de corantes azóico (Amarante, Remazol Preto B, Remazol Laranja, Tropaeolin O), antraquinona (Remazol azul brilhantes) e ftalocianina (Reativo azul), evidenciados pela mineralização total ou parcial dos compostos recalcitrantes (SWAMY; RAMSAY, 1999).

Balan; Monteiro (2001) testaram a capacidade de descoloração de Basidiomycetes em meio líquido. O processo iniciou-se quatro horas após a inoculação, obtendo os seguintes percentuais de degradação do corante índigo: *Phellinus gilvus* (100%), *Pleurotus sajor-caju* (94%), *Pycnoporus sanguineus* (91%) e *Phanerochaete chrysosporium* (75%). Resultados similares foram obtidos com a espécie *Phanerochaete sordida* na degradação do reativo vermelho 120 aos sete dias de incubação (HARAZONO *et al.*, 2003), entretanto a mesma eficiência não observada para *Daedalia squalens* e *D. flavida* (CHANDER; ARORA, 2005)

Os corantes pertencentes aos seguintes grupos; Antraceno: remazol azul brilhante (RBB); trifetilmetano: violeta de etila, violeta de metila, verde de metila e azul cresil brilhante; e os azos: vermelho congo, azul de tripano e o preto amido foram totalmente degradados por *Pleurotus pulmonarius* após seis dias de incubação, enquanto o corante azul de metileno e poly R-478 foram parcialmente degradados (TYCHANOWICZ *et al.*, 2004).

O aumento da complexidade e dificuldade para o tratamento de efluentes têxteis e industriais de um modo geral, tem levado a busca constante de novas metodologias para o tratamento desses rejeitos. Uma solução bastante inteligente e eficaz consiste na utilização de processos combinados para uma melhor eficiência do sistema. Estes métodos podem ser utilizados para suprir deficiências quando aplicados isoladamente (KUNTZ *et al.*, 2002).

Segundo Almeida *et al.* (2004) os tratamentos químicos podem ser utilizados para aumentar a biodegradabilidade de compostos recalcitrantes, diminuindo o tempo de tratamento dos processos biológicos. No caso do efluente papaleiro, a ozonização é capaz de remover significativamente a cor do efluente em um curto tempo, no entanto, a remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) não é satisfatória. Por outro lado, o tratamento biológico com lodo ativado apresenta elevada capacidade de remoção da DQO e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), suprimindo a deficiência do processo oxidativo por ozônio.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.; CAVACO-PAULO, A.; GUBITZ1, G.M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 3357–3362, 2000.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p.997–1026, 2005.

AL-DEGS, Y., KHRAISHEH, M. A. M., ALLEN, S. J., AHMAD, M. Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent. **Water Research**, v.34, p.927-935, 2000.

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

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A.; DURÁN, E. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, p.818-824, 2004.

AMARANTE JÚNIOR, O. P; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. Estudo da adsorção/dessorção de 2,4-D em solos usando técnica cromatográfica. **Eclética Química**, v.27, p.253-261, 2002.

ANNI, H; YONETANI, T. Mechanism of action of peroxidases. In: In: Sigel, H.; Sigel, A. **Metal ions in biological systems**. v.28, New York: Marcel Dekker, 1992, 616p.

ASSIS, R. A.; LOBATO, F.C.F.; SERAKIDES, R. Detecção imunohistoquímica de várias espécies de *Clostridia* em tecidos parafinizados de cobaias inoculadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.25, p.4-8, 2005.

AYALA, M.; HORJALES, E.; PICKARD, M.A; VAZQUEZ-DUHAL, T. R. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. **Biochemical Biophysic Research Commun**, v.4, p.828-831, 2002.

AZMI, W.; SANI, R. K.; BANERJEE, U. C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p.185-191, 1998.

BALAN, D.S. L. Biodegradação e toxicidade de efluentes tóxicos. **Revista ABTT** (Edição de lançamento), p.16-19, 2002.

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

BARRETO, E. S.; SILVA, D. O. E.; PASSOS, F. M. L. Método prático de triagem de colônias de microrganismos secretoras de beta-galactosidase. **Braziliana Journal Microbiology**, vol.31, p.37-38, 2000.

BERGER, B.M. Parameters influencing biotransformation rates of Phenylurea herbicides by soil microorganisms. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.60, n.2, p.71-82, 1998.

BÖCKLE, B.; MARTÍNEZ, M. J.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, Á. T. Mechanism of Peroxidase Inactivation in Liquid Cultures of the Ligninolytic Fungus *Pleurotus pulmonarius*. **Applied Environment Microbiology**, v.65, p. 923–928, 1999.

BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, v.94, p.107-112, 2002.

BORCHERT, M.; LIBRA, J. A., Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnology Bioengineering**, v.75, p.313-321, 2001.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.637-643, 2004.

CARDOSO, E. T.; NEDEL, J. L. Electrophoretic patterns of wheat cultivars in southern Brazil. **Ciências Rural**, v.32, p.203-209, 2002.

CARDOSO, S. P.; REIS, F. A.; MASSAPUST, F. C. Evaluation of common-use indicators as corrosion inhibitors. **Química Nova**, v.28, p.756-760, 2005.

CAROLINA, P.; ROMULO, O.; JOSE, R.; IRINA, U.; JAIME, B.; JUANITA, F.; JAIME, R. Kraft pulp bleaching by dihydroxybenzenes and siderophores from white rot fungi. **Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, v.1, CPPA, Montreal, Canada. p.161-164, 1998.

CASTELLAN, A., PEREZ, D. S.; NOURMAMODE, A.; GRELIER, S.; TERRONES, M. G. H.; RUGGIERO, R. The Improvement of the bleaching of peroxyformic sugar cane bagasse pulp by photocatalysis and photosensitization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.10, p.197-202, 1999.

CHANDER, M.; ARORA, D. S. Evaluation of some white rot fungi their potential to descolourise industrial dyes. **Dyes and pigments**. P.1-7, 2005. (*in press*)

CHANDRAN, C. B.; SINGH, D.; NIGAM, P. Remediation of textile effluent using agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.102, p.207-212, 2002.

CHANG J. S, CHOU C, CHEN S. Y. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. **Process Biochemistry**, v.36, p.757–763, 2001.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distributions. **Micron**, v.35, p.93-96, 2004.

CLEMENTE, A. R; ANAZAWA T. A.; DURRANT L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.255-261, 2001.

COMPANHIA PERNAMBUCANA DO MEIO AMBIENTE (CPRH). **Roteiro complementar de licenciamento e fiscalização para a tipologia têxtil**. Recife, 2001, 125p

CORNAGLIA, G.; FRUGONI, S.; MAZZARIOL, A.; PIACENTINI, E.; BERLUSCONI, A.; FONTANA, R. Activities of oral antibiotics on *Providencia* strains isolated from institutionalized elderly patients with urinary tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.2819–2821, 1995.

COUTO, S.R.; ROSALES, E.; GUNDIN, M.; SANROMÁN, M.Á. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **Journal of Food Engineering**, v.64, p.423-428, 2004.

DESPHANDE, S. D. Ecofriendly dyeing of synthetic fibres. **Ind J Fibre Text Res**, v. 26, p. 136-142, 2001.

DONK, M. A. A conspectus of the families of Aphyllophorales. **Personia**, v.3, p.199-324, 1964.

DRUDING, S. C. Dye History from 2600 BC to the 20th Century. Disponível em: <<http://www.straw.com/sig/dyehist.html>> Acesso em: 18 jan. 2005.

DUFFUS, J. H. Seguridad química: principios básicos de toxicología aplicada - La naturaleza de los peligros químicos. **Módulo de capacitación del IPCS** (Internacional Program Chemical Safety). 2 ed., 1997, 283p.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, cap. 6, p.215-242.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B. Enviromental**, v.28, p.83-99, 2000.

ESPÓSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V. P.; DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. **Journal of Biotechnology**, v.29, p.219-228, 1993.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, cap. 6, p.215-242.

FERREIRA, I. V. L.; DANIEL, L. A. Fotocatálise heterogênea com TiO₂ aplicada ao tratamento de esgoto sanitário secundário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.9, p.335-342, 2004.

FIENLER, N. G.; YILDIZ, I. Faunistic and Morphological Studies on Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from a Small Pond, with Responses of Ciliate Populations to Changing Environmental Conditions. **Turk Jounal Zool.** v.28, p.245-265, 2004.

FONSECA, A. F.; ALLEONI, L. R. F.; MELFI, A. J. Capacidade de troca catiônica de um latossolo tratado com efluente de tratamento de esgoto doméstico. **Scientia Agrícola**, v.62, p.552-558, 2005.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Enviromental international**, v.30, p.953-971, 2004.

FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C.; ALMEIDA, R. S. Remoção de compostos tóxicos de solução aquosa por adsorção com zeólita sintetizada a partir de cinzas de carvão. **Eclética Química**, v.30, p.31-35, 2005.

GILBERTSON, R. L. Wood-rotting fungi of North América. **Mycologia**, v.72, p.1-49, 1980.

GNANAMANI, A.; BHASKAR, M.; GANGA, R.; SEKARAN, G.; SADULLA, S. Chemical and enzymatic interactions of Direct Black 38 and Direct Brown 1 on release of carcinogenic amines. **Chemosphere**, v.56, p.833–841, 2004.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D. Indução de resistência em plantas de trigo por silício e pulgões. **Scientia Agrícola**, s/p, v.62, 2005.

GORGOLIS, V. G.; VASSILIOU, L. F.; KARAKAIDOS, P.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; LILOGLOU, T.; VENERE, M.; DI TULLIO Jr, R. A.; KASTRINAKIS, N. G.; KLETSAS, B. L. D.; YONETA, A.; HERLYN, M.; KITTAS, C.; HALAZONETIS, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v.434, p.907-912, 2005.

GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A. FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v.101, p.49-56, 2003.

GRACE, J. K.; GOODWELL, B. S.; Jones, W. E.; CHANDHOKE, V.; JELLISON, J. Evidence for inhibition of termite (Isoptera: Rhinotermitidae) Feeding by extracellular metabolites of a wood decay fungus. **Proceedings, Hawaiian Entomological Society**, v.31, p.249-252, 1992.

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

HAMANO, P. S.; OROZCO, S. F. B.; KILIKIAM, B. V. Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by *Monascus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 43-49, 2005.

HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, v59, p. 63–68, 2005.

HARAZONO, K.; WATANABE, Y.; NAKAMURA, K. Decolorization of azo dye by the white-rot Basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p.455-459, 2003.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, D. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**, CAB International, Cambridge, 1995, 616p.

HEINFLING, A.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T.; BERGBAUER, M.; SZEWCZYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus ryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2788-2793, 1998.

HU, T. L. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. **Water Science and Technology**, v.43, p.:261–269, 2001.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering Science**, v.3, p.1-19, 2004.

JOHANSSON, T.; NYMAN, P.O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot Basidiomycetes *Trametes versicolor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.300, n.1, p.57-62, 1993.

JONG, E.; DE VRIES, F.P.; FIELD, J. A.; VAN DER ZWAN, R. P. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. **Mycology Research**, v.96, p.1098-1104, 1992.

KÄRRIK, A. **The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds.** Studia Forestalia Suecica, Stockholm, Sweden, 1965, 81p.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R. Biodegradação de efluentes têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v.28, p.629, 632, 2005.

KANTEINEN, A.; HATAKKA, A.; VIIKARI, L. Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.31, p.234-239, 1989.

KALYUZHNYI S, SKLYAR V. Biomineralisation of azo dyes and their breakdown products in anaerobic-aerobic hybrid and UASB reactors. *Water Science and Technology*. v.41, p.23-30, 2000;

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal Chemical Technology e Biotechnology**, v.69, p.141-153, 1997.

KEREM, Z; BAO, W.; HAMMEL, K. E. Extracellular degradation of polyethers by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Biological Sciences Symposium**, p.461-462, 1997.

KHURANA, R., UVERSKY, V. N.; NIELSEN, L.; Fink, A. L. **Journal Biological Chemistry**, v.276, p. 22715 – 22721, 2001.

KIM, Y. S.; RANDOLPH, T. W.; MANNING, M. C.; STEVENS, F. J.; CARPENTER, J. Congo Red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance

aggregation and amyloid fibril formation. **Journal Biological Chemistry**, v.278, p.10842-10850, 2003.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana, **Polímeros Ciência e Tecnologia**, s/v, p.51-57, 1999.

KONSTANTINOU, I. K.; ALBANIS, T. A. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: Kinetic and mechanistic investigations – a review. **Applied Catalysis B. Environmental**, v.49, p.1-14, 2004.

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

LA ROTTA, H. C.E.; BON, E.P.S. 4-Chlorophenol Degradation by Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* formation of insoluble products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 191-204, 2002.

LAZARIN, A. M.; BORGO, C. A.; GUSHIKEM, Y. Filme fino de ZrO₂ enxertado sobre a superfície de sílica gel: preparação e propriedade de adsorção de Cr(VI). **Química Nova**, v.25, p.499-501, 2002.

LEAL, C. C. A. **Avaliação da remoção do corante remazol black B em efluentes têxteis utilizando como adsorvente o mesocarpo do coco verde**. 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003, 54f.

LEATHAM, G. F.; STAHRMAN, M. A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*, specificity, localization and association with the development of fruiting bodies.

Microbiology (ex Journal General Microbiology), v.125, p. 147-157, 1981.

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; BARBOSA, A. M. Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Modified with a Crude Extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 14, p. 297-303, 2003.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREZK, J.; ZIEGENHANGEN, D.; WOJTÁS-WASILEWSKA, M.; Cho, N.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by White rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.175-185. 1999.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; COUTO, S.R.; SANROMAN, A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresour Technology**, v.82, p.109-113, 2002.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Enzymatic determination of dopamine in pharmaceutical formulations using a flow injection analysis system with avocado (*Persea americana*) crude extract. **Química Nova**, v.26, p.197-201, 2003.

MARCHETTO, M.; FERREIRA FILHO, S. S. Interferência do processo de coagulação na remoção de compostos orgânicos causadores de gosto e odor em águas de abastecimento

mediante a aplicação de carvão ativado em pó. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, p.243-252, 2005.

MARTINS, M. A. M; QUEIROZ, M. J.; SILVESTRE, A. J. D.; LIMA, N. Relationship of chemical structure of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Research in Microbiology**, v.153, p. 361-368, 2002.

MÁXIMO, C.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCM1 1019. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 145-151, 2003.

MESHKO, V.; MARKOWSKA, L.; MINCHEVA, M.; RODRIGUES, A. E. Adsorptions of basic dyes on granular activated carbon and natural zeolite. **Water Research**, v.35, p.3357-3366, 2001.

MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJO, G.; LEMA, J. M. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v.36, p.1896-1901, 2002.

MINATTI, E. (Ed.). Corantes – a química das cores. **Revista Eletrônica de Química**. Ano 4. Disponível em: <<http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>> Acesso em: 18 jan. 2005.

MOURA, W. L.; MATUSHIMA, E. R.; OLIVEIRA, L. W. Morphological and cytochemical observations of blood cells of Caiman *Crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, p.0-0, 1999.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.94-100, 2004.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v.21, p.69-72, 1998.

OHKUMA, M.; MAEDA, Y.; JOHJIMA, T.; KUDO, T. Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. **Focused on Ecomolecular Science Research**, s/v, p.39-42, 2001.

OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI.; LEPPÄNEN, V.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4010-4016, 1993.

O'NEIL, M. (ed) J. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 30th ed. New Jersey: Merck & Co., Inc. 2001.

PEGLER, D. N.; SPOONER, B. **Themushroom identifier**. The Apples Press, London, 1992, 144p.

PERIÉ, F. H.; REDDY, G. V. B.; BLACKBURN, N. J.; GOLD, M. H. Purification and characterization of laccases from the write-rot Basidiomycetes *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.353, p.349-355, 1998.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v.61, p121–139, 2004.

POZDNYAKOVA, N. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O. V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis**, v.30, p.19-24, 2004.

PREOBRAZHENSKAYA, Y. V.; BURD, V. N.; VOSKOBOEV, A. I. Immobilization of Chloroperoxidase from *Serratia marcescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, p. 376-379, 2001.

RIBEIRO, F.C.; SILVA, J.C.P.; SANTOS, J.L. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.56, p.709-714, 2004.

RIGAS, F.; DRITSA, V. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005 (*in prelo*)

RODRÍGUEZ, E.; NUERO, O.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccases and versatile peroxidase. **Soil Biology & Biochemistry**. 2004. (in press).

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.967-974, 2003.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v.24, p.77-86, 2001.

ROSSI, C. E.; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Science agrícola**, v.58, p.197-199, 2001.

SANI, R. K.; BANERJEE, U. C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.433-437, 1999.

SANTANA, H.; BONANCEA, C. E.; TAKASHIMA, K. Fotocatálise eletroquímica de atrazina sobre dióxido de titânio: efeito de diferentes parâmetros experimentais. **Química Nova**, v.26, p.807-811, 2003.

SALEM, V. Tingimento têxtil - Apostila do Curso de Tingimento têxtil, Módulo 1, p.65-76, 2000.

SANTOS, A. Z.; TAVARES, C.R.G.; GOMES-DA-COSTA, S.M. Treatment of the effluent from a kraft bleach plant with the white-rot fungus *Pleurotus ostreatoroseus* sing. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p. 371–375, 2002.

SAPARRAT, M. C. N.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied Environment Microbiology**, v.68, p. 1534–1540, 2002.

SAUER, T. **Degradação fotocatalítica de corante e efluente têxtil**. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2002, 24f.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; VARGAS JUNIOR, F. M.; ROSSI, P. Valor Nutritivo do Feno de Braquiária Amonizado com Uréia ou Inoculado com *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.2040-2049, 2003.

SHENG, D.; GOLD, M.H. Haloperoxidase activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.345, p.126-134, 1997.

SIQUEIRA, L. F. G.; ALMEIDA, R. G.; BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*: revisão histórica. **Revista de Saúde Pública**, v.17, p.297-315, 1983.

SILVA, M.; ESPÓSITO, 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, 2004, p.337-378.

SLOKAR, Y. M. ; LE MARECHAL, A. M. Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, p. 335-356, 1998.

SOUZA-CRUZ, P. B.; FREER, J.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p.228-234, 2004.

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

SOUZA SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. Produção de Enzimas Ligninolíticas 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.

STAHL, J.D.; AUST, S. D. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**. v.192, n.2, p.477-482. 1993.

STALPERS, J. A.; LOERAKKER, W. M. *Laetisaria* and *Limonomyces* species (Corticiaceae) causing pink diseases in turf grasses. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p529-537, 1982.

STOLZ A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 80, p.56-69, 2001.

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.

TATARKO, M.; BUMPUS, J. A. Biodegradation of Congo red by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*, v.32, p.1713-1717, 1998.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v. 140, p. 19-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science*, v. 221, p.623-661, 1983.

TSAI, J. H.; CHEN, X. G.; JEYASEELAN, S.; GRHAM, N. Optimising the preparation of activated carbon from digested sewage sludge and coconut husk. *Chemosphere*, v.44, p.45-51, 2001.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal Biotechnology*, v.41, p.1-17, 1995.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de Água no Processo de Tingimento da Indústria Têxtil**. Santa Catarina. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v.39, p.855–859, 2004

TZEAN, S. S.; LIOU, J. Y. Nematophagus resupinate basidiomycetous fungi. **Phytopathology**, v.83, p.1015-1020, 1993.

VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, v.35, p.1131-1138, 2000.

VERÇOSA JÚNIOR, D.; MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M.; GOMES, A. M.; SILVA JUNIOR, P.G.; LAGO, E. P. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.14, p.32-34, 2004.

WALDER, R.; KALVATCHEV, Z.; GARZARO, D.; BARRIOS, M. *In Vitro* antiviral activity from *Fomitella supina*, *Phellinus rhabarbarinus*, *Trichaptum perrottettii* and *Trametes cubensis*. **Fitoterapia**, v.66, p.249-256, 1995a.

WALDER, R.; KALVATCHEV, Z.; GARZARO, D.; BARRIOS, M. *In Vitro* expression of interferon induced by extracts from *Fomitella supina*, *Phellinus rhabarbarinus*, *Trichaptum perrottettii* and *Trametes cubensis*. **Fitoterapia**, v.66, p.510-514, 1995b.

WANG, L.; YAN, J.; HARDY, W.; MOSLEY, C.; WANG, S.; YU, H. Light-induced mutagenicity in *Salmonella* TA102 and genotoxicity/cytotoxicity in human T-cells by 3,3-dichlorobenzidine: a chemical used in the manufacture of dyes and pigments and in tattoo inks. **Toxicology**, v. 207, p.411–418, 2005.

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.161–187, 2003.

WILBERG, K.Q.; NUNES, D.G.; RUBIO, J. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v.17, 13p. 2000

WINTER, B; ZIMMERMANN, W. Degradation of halogenated aromatics by actinomycetes. In: Sigel, H.; Sigel, A. **Metal ions in Biological Systems**. v.28, New York: Marcel Dekker, 1992, 616p

WONG, P.K., YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of N, N-dimethyl-p -phenylenediamine by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1. **Journal Applied and Microbiol**, v.85, p.79-87, 1998.

YI, X.; MROCZKO, M.; MANOJ, K. M.; WANG, X.; HAGER, L. P. Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue. **Biochemistry**, v.96, p.12412-12417, 1999.

YOUNG, L.; YU, J.. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 31, p. 1187-93, 1997.

YU, Z.; WEN, X. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, p.109–114, 2005.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência Hoje**, v. 29, p.61-65, 2001.

ZANOTTI-CAVAZZONI, J. C. Screening de hongos comestíveis que crecen en Paraguay. **Revista de Ciencia y Tecnología**, v.1, p.85-88, 2000.

CAPITULO I

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BASIDIOMYCETES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FENOLOXIDASE

CAPITULO II - ISOLAMENTO DE BASIDIOMYCETES E SELEÇÃO PARA ATIVIDADE FENOLOXIDASE

Resumo

Atualmente, as enzimas produzidas por microrganismos têm sido estudadas na biodegradação, destacando-se as fenoloxidasas com papel importante na biorremediação devido à capacidade em degradar materiais lignocelulolíticos, compostos fenólicos e xenobióticos. Estas enzimas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes provenientes de indústrias de papeis, têxteis, cosméticos, tintas, couros entre outras. O presente trabalho teve como objetivo coletar, isolar e selecionar Basidiomycetes com atividade fenoloxidase. Os basidiocarpos foram coletados em madeiras na Mata do Parque Dois Irmãos Recife-PE. Após análise macroscópica e cortes procedidos para exame microscópico, foram identificadas as seguintes espécies: *Hexagonia hydroides*, *Pleurotus ostreatus*, *Datronia caperata*, *Ganoderma stipitatum*, *Caripia montagnei*, *Trametes membranacea*, *Pycnoporus sanguineus*, *Earliella scabrosa* e *Fomitopsis feei*. Fragmentos do basidiocarpo após assepsia com NaOCl a 3% foram semeados em meio Ágar-Sabouraud acrescido de tetraciclina (100 mg/L) e mantidas à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$). Culturas puras foram utilizadas para detecção da atividade fenoloxidase em meio ágar-malte acrescido de ácido gálico a 0,5% m/V. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram halo marrom acastanhado no meio após o crescimento dos fungos. A maioria dos isolados testados apresentou reações fenoloxidase positiva, exceto *Ganoderma stipitatum* e *Fomitopsis feei* que não formaram halos indicativo da reação.

Palavras-chave – Basidiomycetes, fungos da podridão branca, biodegradação, fenoloxidasas, enzimas lignolíticas,

1. INTRODUÇÃO

Os organismos degradadores de madeiras são importantes agentes utilizados na biodegradação. Entre os mais efetivos estão os fungos da decomposição branca que degradam todos os componentes estruturais da parede celular (lignina, celulose e hemicelulose) e os da decomposição parda ou castanha que envolve principalmente a despolimerização dos componentes polissacarídicos (ALEXOPOULOS *et al.* 1996; FERRAZ, 2004, LEONOWICZ *et al.* 1999). Estes Basidiomycetes tem se destacado pelo seu potencial em degradar compostos lignocelulolíticos e outros fenólicos devido ao seu potencial enzimático (CAMBRIA *et al.* 200; KIRK; CHANG, 1981; SZAKACS; TENGERTDY, 1997), tendo como produto final gás carbônico e água (DURÁN; ESPOSITO, 1997).

Os Basidiomycetes, especialmente os agentes da podridão branca, são capazes de mineralizar compostos lignocelulolíticos e outros fenólicos devido à capacidade de produzir fenoloxidasas. As fenoloxidasas incluem a lacase, a tirosinase e as peroxidases que por sua vez, são constituídas pela manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidase (LiP), (HOFRICHTER, 1983), cloroperoxidase (CLO) (LA ROTTA; BOM, 2002), peroxidase de rabanete (HRP) (IKEHATA *et al.* 2004). De acordo com Winter e Zimmernann (1992), todas estas enzimas catalisam substratos fenólicos .

A importância desses fungos tem sido ressaltada em processos biotecnológicos, tais como no tratamento de efluentes de indústrias (COUTO *et al.* 2004; DURÁN; ESPOSITO, 1997; KNAPP *et al.* 1995), tingimento têxtil (MARTINS *et al.* 2000), na biotransformação de herbicidas (BERGER, 1998), no branqueamento de polpa (CAROLINA *et al.* 1998) e na degradação de explosivos (STAHL; AUTST, 1993).

As fenoloxidasas estão largamente distribuídas na natureza pelos fungos que decompõem os materiais lignocelulolíticos. A degradação ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos (FERRAZ, 2004). Essas enzimas têm assumido papel importante na biorremediação devido à capacidade em degradar materiais lignocelulolíticos, compostos fenólicos e xenobióticos (DURÁN; ESPOSITO, 2000), podendo ser utilizadas no tratamento de efluentes provenientes de indústrias de papeis, cosméticos, tintas, solventes e farmacêuticas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade fenoloxidase de Basidiomycetes coletados e isolados em áreas de Mata Atlântica da Mata do Parque de Dois-Irmãos, Pernambuco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas

As coletas foram realizadas no Parque Dois Irmãos, na área do Açude do Prata, situada em Recife-PE, no período de junho a dezembro de 2003.

Os espécimes coletados em madeira caída foram acondicionados individualmente em sacos de papel, tomando-se o cuidado de retirá-los com uma pequena porção do substrato. Durante as coletas foram feitas observações a respeito do substrato e aspectos de basidiocarpo. As observações macroscópicas dos espécimes foram feitas sempre que possível, a fresco, no local da coleta, referindo-se principalmente a cor, dimensões, forma e consistência do basidioma.

2.2 Identificação

A identificação das espécies foi realizada principalmente com base nas características microscópicas (FIDALGO, 1968), através de cortes finos feitos a mão livre, com lâminas de aço, de partes do contexto e himênio dos basidiomas. Os cortes foram colocados entre lâminas e lamínulas de vidro e clarificado com hidróxido de potássio (KOH) a 3% e solução aquosa de floxina 1% (MARTIN, 1934) para corar as microestruturas e azul de Amann (KOTLABA; KOHLMAYER, 1964) para detectar reação cianófila nas paredes dos esporos e das hifas. O reagente de Melzer (SINGER, 1951) foi utilizado para testar as reações amilóides e dextrinóides de esporos e de outras microestruturas encontradas no himênio, no

contexto e na superfície dos basidiomas. As microestruturas foram analisadas segundo as recomendações de Teixeira (1955).

As espécies fúngicas coletadas foram identificadas através de caracteres macro e microscópicos, utilizando-se de bibliografias especializadas (BONONI, 1984; CAVALCANTI, 1976; GILBERTONI, 2004; GUGLIOTA, 1995; GULGIOTA; CAPELARI, 1995, GUERREIRO; HOMRICH, 1983).

2.3 Isolamento

Foi realizado retirando-se um fragmento do contexto ou do himenóforo com lâmina de aço, mergulhando-se em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por um minuto, colocando-o em seguida, num tubo com agar-sabouraud acrescido de tetraciclina (100mg/L), incubados em temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$), por um período de sete a doze dias até a observação do crescimento micelial (CAVALCANTI, 1972).

2.4 Seleção dos fungos produtores de fenoloxidase

Blocos de 3mm^2 da cultura foram transferidos para placas de petri contendo meio ágar-malte acrescido de ácido gálico a 0,5% m/V e incubados por 10 dias a temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação da atividade enzimática foi realizada através de medições do halo de degradação do substrato com o auxílio de uma régua milimetrada. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram halo acastanhado no meio após o crescimento dos fungos, indicando oxidação do ácido e a presença de oxidase (DAVIDSON *et al.* 1938).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características culturais das espécies

Foram obtidas culturas puras de doze amostras das nove espécies identificadas *Caripia montagnei* (Berk) Kuntze (uma); *Datronia caperata* (Berk.) Ryvarden (duas); *Earliella scabrosa* (Pers. In Gaud) Gilbn. e Ryv. (uma); *Fomitopsis feei* (Fr.) Kresel (uma); *Ganoderma stipitatum* (Murr.) Murr (uma); *Hexagonia hydroides* (Sw. Fr) K. Fidalgo (duas); *Pleurotus ostreatus* (Jacquim Fries) Kummer (uma); *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murr. (duas) e *Trametes membranacea* (Sw.: Fr.) Kreisel (duas). Para as características culturais seguiu-se Nobles (1948).

3.1.1 *Caripia montagnei*

Crescimento moderado atingindo toda a placa em 3 semanas; capa miceliana branca cotonosa elevando-se em determinados pontos, formando uma massa compacta abaixo do micélio de coloração preta, reverso liso, marrom escuro.

3.1.2 *Datronia caperata*

Crescimento moderado atingindo toda a placa em 3 semanas, capa miceliana crostosa parda a princípio, tornando-se posteriormente marrom escuro; reverso liso, preto.

3.1.3 *Earliella scabrosa*

Crescimento rápido recobrimdo a placa em 10 dias. Colônia inicialmente branca, tornando-se um pouco parda, capa miceliana crostosa marrom-escuro; reverso cor de mel.

3.1.4 *Fomitopsis feei*

Crescimento rápido, recobrando a placa em 10 dias; colônia pulverulenta, branca inicialmente, tornando-se, posteriormente bege rosada, com áreas um pouco elevadas; reverso bege claro.

3.1.5 *Ganoderma stipitatum*

Crescimento lento, atingindo toda a placa em 4 semanas, colônias de micélio brancas, reverso liso, cor de mel.

3.1.6 *Hexagonia hydroides*

Crescimento lento, atingindo 5 cm. de diâmetro em 3 semanas. Capa miceliana crostosa, marrom clara; margem difusa; reverso marrom-escuro.

3.1.7 *Pleurotus ostreatus*

Crescimento moderadamente rápido, atingindo toda placa em duas semanas; capa miceliana branca, cotonosa, alamosa; margem lisa; reverso liso, cor de mel. Após 4 semanas de cultivo, a capa micelial eleva-se, formando uma massa compacta, na qual se observa áreas férteis.

3.1.8 *Pycnoporus sanguineus*

Crescimento rápido, recobrando a placa em 10 dias; colônia zonada, branca a princípio, tornando-se, posteriormente, salmon-clara, pulverulenta, com área concêntricas e elevadas, de cor escarlate, cotonosas, apresentando grânulos e poros também de cor escarlate; margem lisa; reverso zonado, cor de mel.

3.1.9 *Trametes membranacea*

Crescimento rápido recobrimdo a placa em 10 dias; colônia branca cotonosa, reverso amarelo creme.

3.2. Seleção dos fungos produtores de fenoloxidase

Para a atividade de fenoloxidase, teste para avaliar a habilidade do fungo em degradar componentes fenólicos, os isolados exibiram uma variabilidade na produção dessa enzima. Das doze amostras isoladas dez apresentaram reação positiva em ácido gálico (formação de halo com pigmentação castanho avermelhado), indicando a presença de fenoloxidase no meio de cultivo e duas amostras apresentaram reação negativa. (Tabela 1, Figura 1).

Jong *et al.* (1992) e Saparrat *et al.* (2000) isolaram e quantificaram a atividade peroxidativa de linhagens de *Trametes*, revelando a habilidade em produzir lacase e manganês peroxidase, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa. Entretanto, o primeiro autor relata que não foi detectada atividade para lignina peroxidase. De acordo com Tuor *et al.* (1995) os fungos da podridão branca podem produzir simultaneamente as fenoloxidasas MnP e lacases, mas podem secretarem Lip a níveis não detectáveis.

Maziero *et al.* (1999) selecionaram diferentes isolados fúngicos, para produção de exopolissacarídeos, obtidos em diferentes ecossistemas brasileiros. Os autores correlacionaram à produção de polissacarídeos extracelulares com a atividade Lip, constatando uma boa atividade enzimática para as linhagens que produziram mais de 2,0 g peso seco/L de exopolissacarídeos. Dentre as linhagens, *Pleurotus ostreatus* apresentou boa resposta enzimática, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Entretanto Mazieiro *et al.* (1999) não observaram uma boa atividade enzimática para *Pycnoporus*

sanguineus, diferindo assim dos nossos resultados e dos apresentados por Saparrat *et al.* (2000).

Tabela 1. Crescimento das espécies submetidas à atividade fenoxidase através do ácido gálico.

Espécie	Tipos de Decomposição da madeira	Halo (cm)	
		Tempo em dias	
		5°	10°
<i>C. montagnei</i>	Podridão branca	3,5	4,0
<i>D. caperata</i>	Podridão branca	3,0	3,5
<i>E. scabrosa</i>	Podridão branca	4,5	5,0
<i>F. feei</i>	Podridão marrom	-	-
<i>G. stipitatum</i>	Podridão branca	-	-
<i>H. hydroides</i>	Podridão branca	2,5	4,0
<i>H. hydroides</i>	Podridão branca	3,0	4,5
<i>P. ostreatus</i>	Podridão branca	3,0	4,0
<i>P. sanguineus</i>	Podridão branca	5,0	6,0
<i>P. sanguineus</i>	Podridão branca	4,0	5,0
<i>T. membranacea</i>	Podridão branca	3,5	5,0
<i>T. membranacea</i>	Podridão branca	3,5	4,5

As fenoxidases são produzidas principalmente por Basidiomycetes da podridão branca, sendo também detectada em fungos da podridão marrom (DURÁN; ESPÓSITO, 1997). Kirk e Kelman (1965) relataram que muitos Basidiomycetes produzem fenoxidases extracelular detectável pela formação de halos em meio contendo fenóis. Com algumas

exceções, espécies que produzem tais enzimas são fungos da podridão branca que podem decompor lignina, celulose e outros constituintes da madeira. Ao contrário, os fungos da podridão marrom não produzem essas enzimas. O método de isolamento e seleção descrito neste trabalho revelou a atividade peroxidativa da maioria das espécies, com exceção de *Fomitopsis feiii* (podridão-marrom) e *Ganoderma stipitatum* (podridão-branca), o que sugere capacidade reativa diferenciada para estes fungos (KÄÄRIK, 1965).

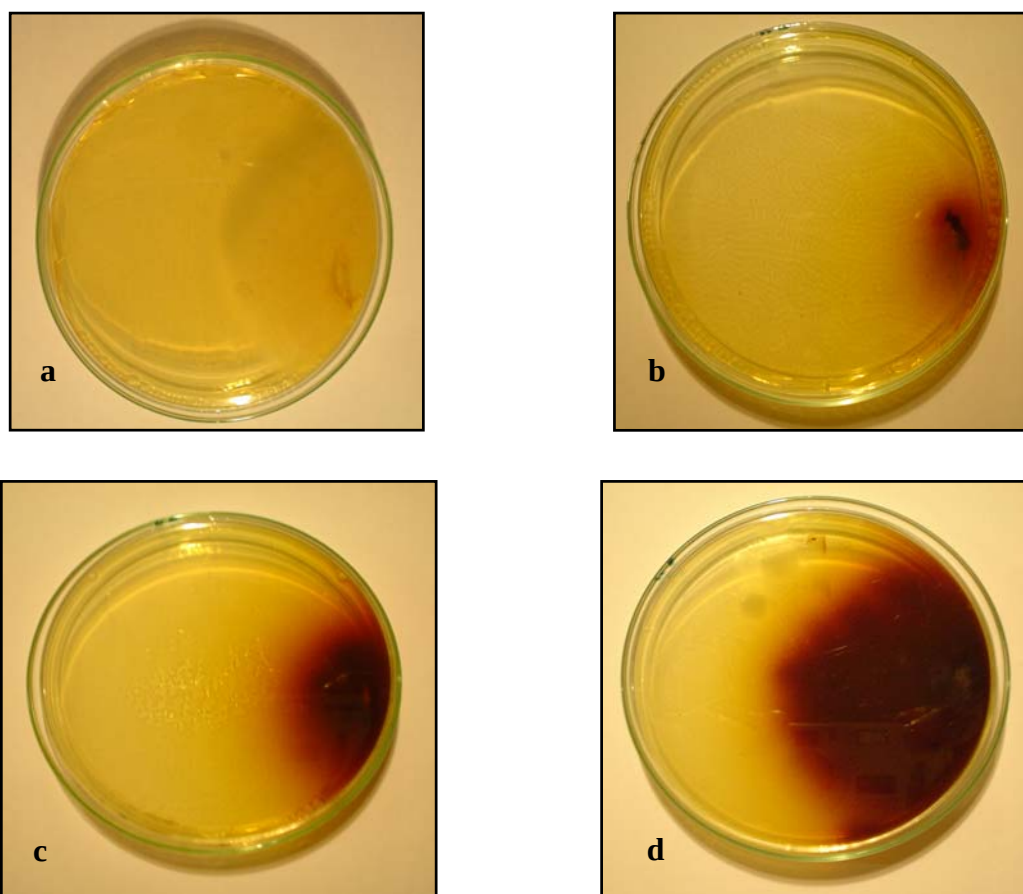


Figura 1. Reação de fenoloxidase em ágar malte acrescido de ácido gálico, após 10 dias de inoculação. a) *Fomitopsis feei* (Reação negativa), b) *Hexagonia hydroides*, c) *Trametes membranacea* e d) *Pycnoporus sanguineus* (Reação positiva).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERGER, B.M. Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 60,.2,71-82, 1998.

BONONI, V. L. Basidiomycetes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: IV. Adições às famílias Hymenochaetaceae, Stereaceae e Thelephoraceae. **Rickia**, 11, .43-52, 1984.

CAMBRIA, M. T.; CAMBRIA, A.; RAGUSA, S.; RIZZARELLI, E. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, 18, .141-147, 2000.

CAROLINA, P.; ROMULO, O.; JOSE, R.; IRINA, U. JAIME, B.; JUANITA, F.; JAIME, R. Kraft pulp bleaching by dihydroxybenzenes and siderophores from White rot fungi. **Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, 1, CPPA, Montreal, Canada., 161-164, 1998.

CAVALCANTI, M.A.Q. Caracteres culturais de alguns Basidiomycetes isolados em Recife. Universidade Federal de Pernambuco – Instituto de Micologia - Departamento de Micologia Biotológica. Recife, 1972.

CAVALCANTI, M.A.Q. Introdução ao conhecimento dos Basidiomycetes poliporóides da Zona da Mata de Pernambuco. Recife, 1976, 200p. (Tese de livre-docência, Universidade Federal de Pernambuco. Recife).

COUTO, S.R.; ROSALES, E.; GUNDIN, M.; SANROMÁN, M.Á. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **Journal of Food Engineering**, .64, .423-428, 2004.

DAVIDSON, R. W.; CAMPBELL, W. A.; BLAISDELL, D. J. Differentiaton of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal Agriculture Research**, 57, 683-695, 1938.

DURÁN N.; ESPÓSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (ed.) **Microbiologia Ambiental**. Jaguarariúna: Embrapa-CNPMA,.12, .269-292, 1997.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potencial applications of oxidative enzymes and phonoloxidase-like compouds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B. Enviromental**, 28, 83-99, 2000.

FERRAZ, A. L. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, Caxias do Sul: Educs, 215-242, 2004.

FIDALGO, O. As microestruturas e sua importância na sistemática dos fungos superiores. **Rickia**, .3, 117-159, 1968.

GILBERTONI, T.B. Basidiomycotina (Aphyllphorales) em áreas de Mata Atlântica de Pernambuco. . Recife, 1999, 115p. (Dissertação.Biologia de Fungos, Departamento de Micologia. UFPE).

GILBERTONI, T.B. Aphyllphorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. . Recife, 2004, 258p. (Tese. Biologia de Fungos, Departamento de Micologia. UFPE).

GUGLIOTTA, A M. Polyporaceae de mata ciliar da Estação Experimental e reserva Biológica de Moji-Guaçu, SP, Brasil. **Hoheneia**, .24,.2, .89-106, 1997.

GUGLIOTTA, A M.; CAPELARI, M. Polyporaceae from Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Mycotaxon**, 56, 107-113, 1995.

GUERRERO, R.T.; HOMRICH, M. **Fungos Macroscópicos Comuns do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul, 1983, 118p..

HOFRICHTER, M. Review; lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbial Technology**, 30, 454-466, 2002.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidase and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering Science**. 3, 1-19, 2004.

JONG, E.; DE VRIES, F.P.; FIELD, J. A.; VAN DER ZWAN, R. P. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. **Mycology Research**, .96, .1098-1104, 1992.

KÄÄRIK, A. **The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds**. Studia Forestalia Suecica, , 1965, 81p.

KIRK, T. K.; CHANG, H. Potential applications of bio-ligninolytic systems. **Enzyme and Microbial Technology**, 3, 189-196, 1981.

KIRK, T. K.; KELMAN, A. Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying Basidiomycetes. **Phytopathology**, .55, .739-745, 1965.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, 17, .664-668, 1995.

KOTLABA, F.; KOHLMAYER, E. The Higher Fungi. **Marine mycology**. New York, Academic Press, 1964.

LA ROTTA, H. C.E.; BON, E.P.S. 4-Chlorophenol Degradation by Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* formation of insoluble products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 98,. 191-204, 2002.

LEONOWICZ, A; MATUSZEWSKA, A; LUTEREZK, J.; ZIEGENHANGEN, D; WOJTÁS-WASILEWSKA, M, CHO, N; HOFRICHTER, M; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by White rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, .27, 175-185. 1999.

MARTIN, C. G. Three new Heterobasidiomycetes. **Mycologia**, .26, 261-265, 1934.

MARTINS, M. A. M.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, .89, 91–98, 2001.

MAZIERO, R.; CAVAZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, 30, 77-84, 1999.

NOBLES, M. K. **Studies in Forest Pathology VI identification of cultures of wood-rotting fungi. Separata de Canadian Journal of Research C**, .26, 281-431, 1948.

SAPARRAT, M. C. N.; BUCSINSZKY, A. M. M.; TOURNIER, H. A.; CABELLO, M. N.; ARAMBARRI, A. M. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 17, 64-68, 2000.

SINGER, R. The Agaricales (mushrooms) in Modern Taxonomy. **Lilloa**. Tucumán. 1951. 832p

STAHL, J.D.; AUST, S. D. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**. 192, 477-482. 1993.

SZAKACS, G.; TENGEDY, R. P. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 13, 487-490, 1997.

TEIXEIRA, A. R. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. **Instituto de Botânica**. Manual, n.6, São Paulo. 1955. 20p.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, 41, 1-17, 1995.

WINTER, B; ZIMMERMANN, W. Degradation of halogenated aromatics by actinomycetes. In: SIGEL, H.; SIGEL, A. **Metal ions in Biological Systems**. 28, New York: Marcel Dekker, 1992, 616p.

CAPÍTULO II

DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMYCETES ISOLADOS DE MADEIRAS DA MATA ATLÂNTICA-PE-BRASIL

DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMYCETES ISOLADOS DE MADEIRAS DA MATA ATLÂNTICA-PE-BRASIL.

E. S. Lyra¹, K. A. Moreira⁴, F. B. Paz Júnior⁶, B.B. Neto⁷, J. L. Lima-Filho^{4, 5}; M. A. Q. Cavalcanti² e A. L. F. Porto^{3, 4*}

¹ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE, Brasil

² Departamento de Micologia-UFPE, Brasil.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE, Brasil

⁴ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA-UFPE, Brasil;

⁵ Departamento de Bioquímica- UFPE, Brasil.

⁶ Centro Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco – CEFETPE Pesqueira, Brasil.

⁷ Departamento de Química Fundamental- UFPE, Brasil.

*Autor para correspondência: Tel. 0055-81-33206391, Fax: 0055-81-33206057 E-mail:

eslyra2005@yahoo.com.br/ analuporto@yahoo.com.br

Sumário

A remoção de poluentes orgânicos é um dos grandes problemas ambientais enfrentados pelo setor industrial. Os processos físicos e químicos de descoloração são onerosos, deixam muitos resíduos e são poucos eficientes. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de biodegradação de corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil por Basidiomycetes coletados em madeiras na Mata Atlântica do Parque Dois Irmãos-PE. Dentre os fungos, identificou-se as seguintes espécies: *Caripia montagnei*, *Datronia caperata*, *Earliella scabrosa*, *Fomitopsis feei*, *Ganoderma stiptatum*, *Hexagonia hydroides*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea*. Discos de micélio (2cm²) de cada isolado fúngico foram transferidos para frascos de Erlenmayer de 125 mL contendo 30 mL do meio de KING acrescido de

0,05% m/v dos seguintes corantes: alaranjado de metila (LM), azul de bromofenol (AB), azul de metileno (AM), vermelho congo (VC), vermelho de fenol (VF) e verde de metila (VM). Em seguida, foram incubados em agitador orbital (130rpm), durante 10 dias a temperatura ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$). As amostras fúngicas mostraram potencial para descolorir os corantes testados com percentual de descoloração variando de 7,26% a 99,25% no decorrer do experimento. Os fungos *H. hydroides* e *T. membranacea* foram capazes de degradar todos os corantes testados, sendo os corantes AB e AM degradados por todos os fungos. O AB foi fortemente degradado por *P. sanguineus* (97,37%), *H. hydroides* (95,60%), *E. scabrosa* (96,62%) e *T. membranacea* (99,25%). De acordo com a análise dos componentes principais, o isolado *E. scabrosa* destacou-se entre os isolados na descoloração dos corantes, alcançando valores superiores a 90% para os corantes VM, VF e AB.

Key words: Basidiomycetes, biodegradação, corantes, descoloração, tratamentos de efluentes.

Introdução

Os corantes são substâncias bastante utilizadas na indústria têxtil, alimentícia, de curtimento do couro, de papel, de cosmético, farmacêutica entre outras (Antunes & Araújo, 2000; Kapor *et al.* 2001; Brasil *et al.* 2003; Osugi *et al.* 2003; Aksu, 2005; Dallago *et al.* 2005; Gong *et al.* 2005). Entretanto, podem causar graves riscos a saúde de todas as formas de vida por apresentarem propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas (Clonfero *et al.* 1990; Jäger *et al.* 2004; Mathur *et al.* 2005).

Os corantes são compostos químicos orgânicos que possuem a capacidade de absorver a luz visível seletivamente devido à presença de grupos cromóforos tais como; nitro, nitroso, azo e carbonila (Kimura *et al.* 1999). Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidas anualmente no mundo, sendo o Brasil responsável por 2,6% dessa demanda. Pelo menos 20% dos corantes têxteis fabricados no país são descartados

como efluentes e, se não forem tratados adequadamente antes de serem lançados em águas naturais, esses compostos podem provocar danos graves ao ecossistema e à saúde da população (Zanoni & Carneiro, 2001).

Os resíduos industriais provenientes dos corantes são geralmente tratados por métodos físico-químicos. Estes processos são onerosos, produzem muito resíduos, e são poucos eficientes (Azmi *et al.* 1998; Al-Degs *et al.* 2000; Wilberg *et al.* 2000; Meshko *et al.* 2001; Tsai *et al.* 2001; Zanoni & Carneiro, 2001; Forgacs *et al.* 2004). Atualmente, os processos biológicos têm adquirido atenção cada vez maior por serem de baixo custo e os seus produtos e subprodutos formados da completa mineralização não agredem o meio ambiente (Stolz, 2001).

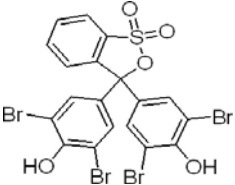
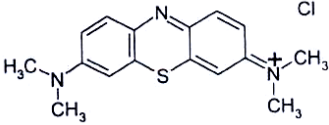
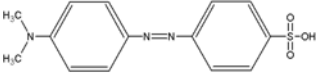
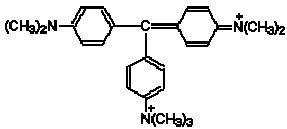
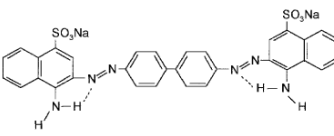
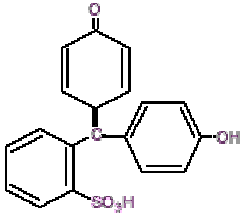
Em face aos problemas advindos dos tratamentos não biológicos, grande número de microrganismos tem sido empregado para descoloração de corantes. Dentre estes, destacam-se os Basidiomycetes, em particular os causadores da podridão branca e marrom da madeira, por apresentarem um forte arsenal enzimático (sistema lignocelulolítico e as peroxidases). A importância do complexo enzimático desses fungos está diretamente relacionada com a descoloração de uma ampla variedade de poluentes orgânicos, devido as suas enzimas degradadoras de constituintes da madeira. Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência destes organismos no processo de descoloração de corantes industriais (Knapp *et al.* 1995; Tatarko & Bumpus, 1998; Perié *et al.* 1998; Kirby *et al.* 2000; Martins *et al.* 2001; Martins *et al.* 2003; Wesenberg *et al.* 2003; Blánquez, *et al.* 2004; Couto *et al.* 2004; Kim *et al.* 2004; Novotny *et al.* 2004; Kamida & Durrant, 2005; Seys & Aksoz, 2005).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de descoloração de corantes utilizados na indústria têxtil por Basidiomycetes isolados de madeiras da Mata Atlântica-PE.

Materiais & Métodos

Corantes – Foram utilizados os seguintes corantes sintéticos (Tabela 1): azul de bromofenol (Sigma), azul de metileno (Sigma), Alaranjado de metila (Vetec), verde metil (Sigma), vermelho congo (Sigma) e vermelho fenol (Vetec).

Tabela 1. Características químicas dos corantes utilizados no experimento.

Corantes	Ionização	$\lambda(\text{nm})^a$	Classe química	Estrutura química	Peso molecular
Azul de bromofenol	Ácido	595	trifenil metano		669,96
Azul de metileno	Ácido	662	tiazina		319,9
Alaranjado de metila	Ácido	502	azo		327,34
Verde de metila	Básico	630	triarilmeta no		458,5
Vermelho congo	Ácido	490	diazo		696,6
Vermelho fenol	Básico	490	azo		354,38

^a Absorção máxima a $\lambda(\text{nm})$.

Microrganismos - *Cariphia montagnei*, *Datronia caperata*, *Fomitopsis feei*, *Ganoderma stiptatum*, *Hexagonia hydroides*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes membranacea* e *Earliella scabrosa* coletados e isolados na Mata Atlântica - PE. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-malte a 28° C.

Descoloração de corantes sintéticos – A detecção da descoloração de corantes foi realizada segundo Silva *et al* (2003), onde foram semeados 2cm² do micélio de cada isolado, crescido em ágar-malte por 10 dias, em frascos de Erlenmayer (125 mL) contendo 30 mL do meio de KING a 0,05% m/v de concentração de cada um dos corantes: azul de metileno (AM), azul de bromofenol (AB), verde de metil(VM), vermelho de fenol (VF), vermelho congo (VC) e alaranjado de metila (LM) . Em seguida foram incubados em agitador orbital (130rpm) a 28 °C, no escuro, durante dez dias. Após esse período, o micélio foi separado por filtração em membrana milipore (0,45 µm). O filtrado obtido foi utilizado para avaliar o grau de descoloração de cada corante. Cada tratamento foi realizado em duplicata e o controle foi realizado nas mesmas condições, mas sem inoculação do fungo.

Determinação da redução de cor – A determinação da redução de cor foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Micronal, modelo B582, Brasil) e calculada de acordo com a equação 1. Os comprimentos de ondas utilizados para cada corante estão apresentados na Tabela 1. Foi realizada a varredura em espectro UV-VIS (Amersham modelo 3000) no comprimento de onda (200-800nm) das amostras de azul de bromofenol que apresentaram descoloração superior a 50%, sendo calculadas de acordo com a equação: % Descoloração = $(A - B/A) \times 100$, onde, A é a absorvância dos filtrados das culturas após 10 dias de crescimento e B é a absorvância do controle. A análise dos componentes principais da descoloração dos corantes foi efetuada utilizando-se o programa Statística 6 (Jolliffe, 2002).

Resultados & Discussão

A habilidade dos nove isolados fúngicos em degradar os seis tipos de corantes com as mais variadas estruturas químicas foi testada. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2, onde foi observado que todos corantes foram degradados em graus variados de acordo com a espécie fúngica isolada.

Observou-se que apenas três dos corantes testados foram fortemente degradados (>95%) por um ou mais isolados. *T. membranacea* e *H. hydroides* foram os únicos isolados que conseguiram degradar todos os corantes testados nas condições analisadas. Os resultados demonstram as diferenças entre os fungos quanto à habilidade em descolorir corantes sintéticos e suas especificidades particular por um determinado corante

O corante azul da bromofenol (AB) foi degradado por todos os fungos testados, destacando nesse processo *T. membranacea*, *P. sanguineus*, *E. scabrosa*, *H. hydroides*, que descoraram, nessa ordem, 99,25%, 97,37%, 96,62% e 95,60% do meio com o corante. Resultados semelhantes foram obtidos por Ollikka et al. (1993) quando trabalharam com *Phaenorochea chrysosporium* na descoloração do mesmo corante, obtendo 93% de descoloração.

O azul de metileno (AM) também foi descorado por todos os fungo testado, entretanto os percentuais foram tão significativos quanto os observados para o AB. Os isolados *D. caperata* (74,32 %), *T. membranacea* (71,76%) e *H. hydroides* (71,39%) foram mais eficientes em degradar o AM. Ollika et al. (1993) observaram descoloração em torno de 90% do corante com *P. chrysosporium*. Por outro lado, Novotný et al. (2004) obtiveram percentuais de descoloração inferiores a 25% com o Basidiomycetes *Irpex lacteus*.

Tabela 2. Percentual de descoloração dos corantes sintéticos utilizados no experimento.

Isolados	Percentual de descoloração dos corantes (%)					
	AB	AM	LM	VM	VC	VF
<i>Caripia montagnei</i>	21,23	52,00	10,30	91,88	0	17,00
<i>Datronia caperata</i>	61,74	74,32	14,10	19,73	20,30	0
<i>Earliella scabrosa</i>	96,62	19,72	38,50	96,52	0	95,80
<i>Fomitopsis feei</i>	64,83	7,26	12,80	0	0	0
<i>Ganoderma stiptatum</i>	20,96	44,25	10,30	0	67,30	0
<i>Hexagonia hydnoides</i>	95,60	71,39	52,60	14,39	46,7	10,72
<i>Pleurotus ostreatus</i>	16,31	10,29	0	0	54,20	0
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	97,37	54,50	52,60	0	72,60	43,13
<i>Trametes membranacea</i>	99,25	71,76	14,10	95,36	44,00	25,40

Azul de metileno (AM), azul de bromofenol (AB), verde de metil (VM) e vermelho de fenol (VF), vermelho congo (VC) e alaranjado de metila (LM).

Quanto à descoloração do vermelho de fenol, seis dos nove isolados fúngicos não foram capazes ou eficientes em degradar pelo menos 50% do corante. Os experimentos demonstraram que similarmente a outros fungos da podridão branca como o *Trametes versicolor* (Rancaño *et al.* 2003), *Irpex lacteus* e *Pleurotus ostreatus* (Novotný *et al.* 2001), o isolado *E. scabrosa* foi bastante eficiente na descoloração do vermelho de fenol (95,80%).

Nas condições laboratoriais trabalhadas, os fungos *C. montagnei*, *E. scabrosa* e *F. fei* não foram capazes de degradar o vermelho congo. Crips *et al.* (1990) relataram que o Basidiomycete *Phanerochaete crisosporium* apresentou comportamento semelhante ao

encontrado neste trabalho. Entretanto, os isolados *G. estiptatum* e *Pycnoporus sanguineus* foram capazes de degradar, respectivamente 67,3% e 72,6% do corante azo vermelho congo. A habilidade de fungos da podridão branca em degradar esse corante também foi estudada por Olikka et al (1993) e Tatarko & Bumpus (1998). O primeiro autor observou descoloração de 54% do corante, enquanto o segundo observou níveis de descoloração acima dos 70% entre o terceiro e o quinto dia, demonstrando o papel desse corante como substrato para lignina peroxidase.

Quanto ao vermelho de metila, os maiores percentuais de diminuição da concentração do corante foram observados para *C. montagnei* (91,88%), *E. scabrosa* (96,52%) e *T. membranacea* (95,36%). Os demais isolados não foram eficientes ou capazes de degradar o corante. Quanto à descoloração do corante alaranjado de metila, apesar de ter sido degradado pela maioria dos isolados, excetuando-se *Pleurotus ostreatus* que não degradou, os níveis de descoloração não foram significativos.

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 azul 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 com os encontrados neste trabalho permitem inferir que os isolados de *E. scabrosa*, *T. membranacea*, *H. hydroides* e *P. sanguineus* também podem ser aplicados na biorremediação de efluentes industriais.

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 (Olikka et al. 1993; Leonowicz et al. 1999; Silva et al. 2003).

Análise dos componentes principais na descoloração de corantes sintéticos por fungos

O componente principal 1 foi responsável pela explicação de 40,65 % da variação dos resultados e o componente principal 2 representa 30,17 %, significando que o plano cartesiano (1 x 2) representa 70,82 % da variação total dos resultados.

O primeiro componente principal (Fator 1) refere-se à combinação linear dos corantes que apresentam peso positivo, exceto o vermelho congo o qual possui peso negativo. O segundo componente principal (Fator 2) contrasta o verde de metila e o vermelho de fenol (pesos positivos) com os demais corantes com peso negativo. Isto significa que os fungos com alto poder de descoloração tende a ter escores positivos, principalmente porque o fator 1 apresenta a maioria dos corantes com escore positivo e explica 41,3% dos resultados. Quanto mais próximos do círculo estiverem os corantes, maior é o potencial biodegradativo dos isolados (Figura 1).

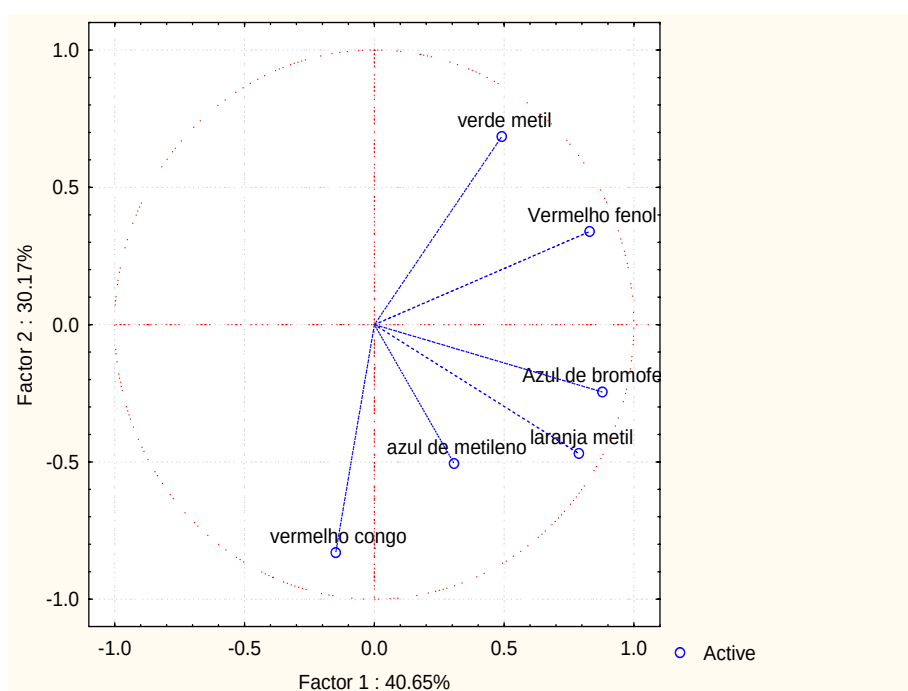


Figura 1. Gráfico dos pesos na 1ª e 2ª componentes principais.

Um fungo que se destacou na descoloração dos corantes foi o *E. scabrosa*, pois ele foi capaz de degradar o verde de metila (96,52%), o vermelho de fenol (95,80%) e o azul de bromofenol (96,62%), resultando no seu posicionamento no quadrante superior direito (positivo) da Figura 2.

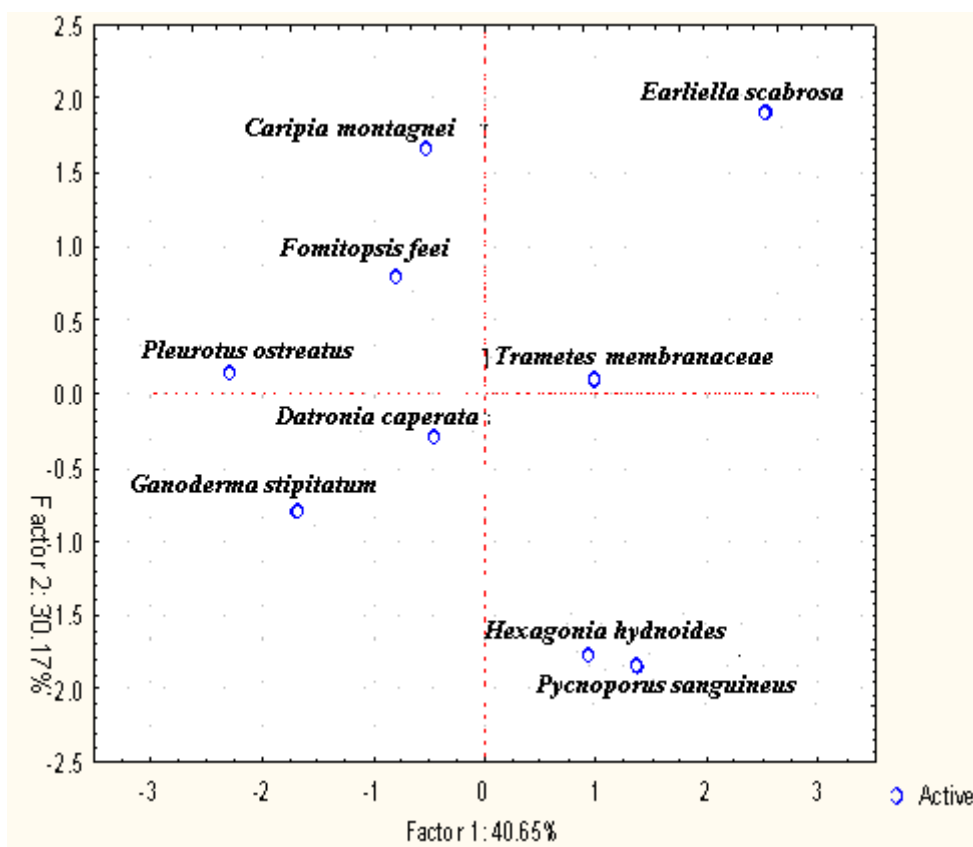


Figure 2. Escores dos isolados dos componentes principais

De acordo com a representação na Figura 2, *P. ostreatus*, *F. feei* e *G. stipitatum* apresentaram menor capacidade degradativa (os escores mais negativos), ficando posicionados no quadrante inferior esquerdo.

A Figura 3 apresenta os espectros de absorção obtidos para o corante azul de bromofenol tratado com *C. montagnei*, *D. caperata*, *F. feei*, *G. stiptatum*, *H. hydroides*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus*, *T. membranacea* e *E. scabrosa*. A maioria dos isolados

apresentaram uma diminuição da adsorção dos espectros de absorvância a 590 nm, evidenciando uma alta capacidade de descoloração. Novotny et al. (2004) pesquisando a biodescoloração de vários corantes sintéticos por um fungo da podridão branca *Irpex lacteus*, observaram 96% de descoloração do azul de bromofenol em duas semanas. *D. caperata* e *F. feii* apresentaram maiores espectros de absorção, demonstrando uma menor habilidade em degradar o azul de bromofenol quando comparados com os demais tratamentos.

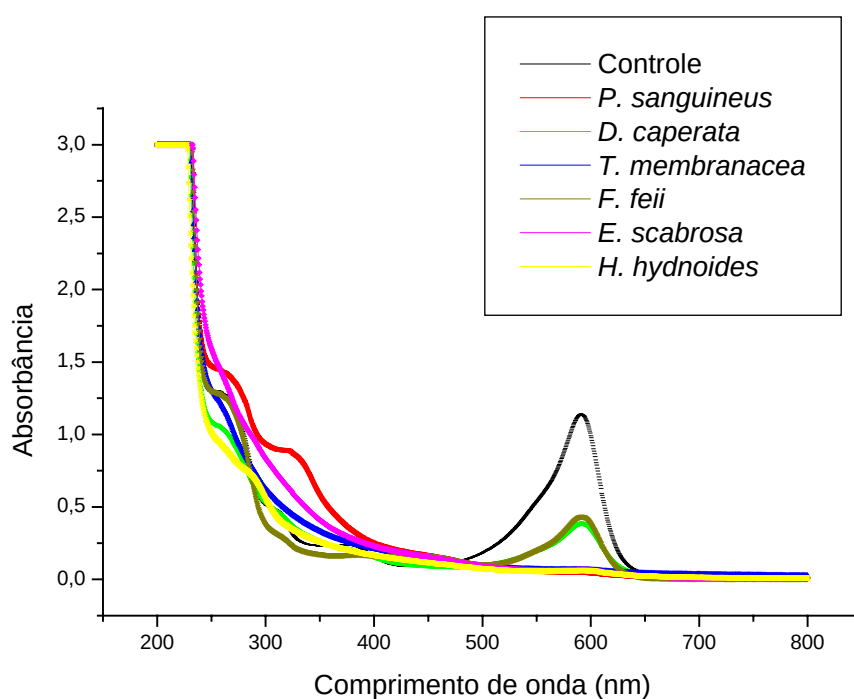


Figura 3. Espectro UV-VIS do corante azul de bromofenol antes (controle) e depois do tratamento (fungos).

Conclusões

As espécies *Earliella scabrosa*, *Hexagona hydroides*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea* apresentaram boa capacidade de descoloração sobre os corantes estudados, sugerindo sua aplicabilidade para o tratamento de resíduos industriais; os isolados, excetuando-se *Earliella scabrosa*, não foram eficientes no processo de descoloração do vermelho fenol; A descoloração dos corantes pode ser usada como parâmetro para selecionar fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas; os isolados fúngicos *P. sanguineus*, *H. hydroides*, *E. scabrosa* e *T. membranacea* apresentaram maior potencial de descoloração do corante azul de bromofenol.

Referências

- Aksu, Z. (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40: 997–1026.
- Blánquez, P, Casas N, Font X et al (2004) Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* 38: 2166–2172.
- Couto SR, Rosales E, Gundin M et al (2004) Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of Food Engineering* 64: 423-428.
- Dallago RM, Smaniotto A, Oliveira LCA. (2005) Resíduos sólidos de curtumes como adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso. *Química Nova* 28: 433-437.
- Forgacs E, Cserhádi T, Oros G (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International* 30: 953-971.
- Gong R, Ding Y, Li M et al (2005) Utilization of powdered peanut hull as biosorbent for removal of anionic dyes from aqueous solution. *Dyes Pigment* 64: 187-192.
- Jäger I, Hafner C, Schneide K (2004) Mutagenicity of different textile dye products *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. *Mutation Research* 561: 35-44.
- Jolliffe I. T (2002) *Principal component analysis*, 2 ed, New York: Springer.

Kamida H.M, Durrant L.R (2005) Biodegradação de efluentes têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. Química Nova 28: 629-632.

Kim T, Lee Y, Yang J et al (2004) Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. Desalination 168: 287-293.

Kimura I.Y, Gonçalves A.C. Jr, Stolberg J et al (1999) Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 51-57.

Leonowicz A, Matuszewska A, Luterezk J et al (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology 27: 175-185.

Mathur N, Bhatnagar P, Bakre P (2005) Assessing mutagenicity of textile dyes from pail (rajasthan) using ames bioassay. Applied Ecology and Environmental Research 4: 111-118.

Meshko V, Markowska L, Mincheva M, Rodrigues AE. (2001) Adsorptions of basic dyes on granular actived carbon and natural zeolite. Water Research 35: 3357-3366.

Novotný C, Rawal B, Bhatt M et al (2001) Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. Journal of Biotechnology 89: 113-122.

Novotný C, Svobodová K, Kasinath A et al (2004) Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 54: 215 – 223.

Ollikka P, Alhoniemi L.V, Glumoff T et al (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 59, 4010-4016.

Rancaño G, Lorenzo M, Molares N, et al (2003) Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. Process Biochemistry 39: 467-473.

Seys I, Aksoz N (2005) Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. International Biodeterioration & Biodegradation 55: 115-119.

Silva C.M.M.S, Melo I.S, Oliveira P.R (2003) Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. Brazilian Journal of Microbiology 34: 53-55.

Silva C.M.M.S, Melo I.S, Oliveira P.R (2004) Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Isolados de Solos sob Cultivo de Arroz Irrigado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento/Embrapa Meio Ambiente, 18p.

Stolz A (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Applied Microbiology Biotechnology 80: 56-69.

Tatarko M, Bumpus J.A (1998) Biodegradation of Congo red by *Phanerochate chrysosporium*. Water Research 32: 1713-1717.

Tsai J.H, Chen X.G, Jeyaseelan S, Grham N (2001) Optimising the preparation of activated carbon from digested sewage sludge and coconut husk. Chemosphere 44: 45-51.

Tychanowicz G.K, Zilly A, Souza C.G.M et al (2004) Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. Process Biochemistry 39: 855–859.

Yonni F, Moreira M.T, Fasolia H et al (2004) Simple and easy method for the determination of fungal growth and decolourative capacity in solid media. International Biodeterioration & Biodegradation 54: 283 – 287.

Zanoni M.V.B, Carneiro P. A (2001) O descarte dos corantes têxteis. Ciência Hoje 29: 61-65.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZO
ALARANJADO II E PRETO V POR *Pycnoporus sanguineus* E *Trametes membranacea*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZOS ALARANJADO II E PRETO V POR *Pycnoporus sanguineus* E *Trametes membranacea*.

Mancilha, E. S. L.¹, Paz Júnior, F. B.², Porto, T. S.³, Cunha, M. N. C.³, Neto, B.B.⁴, Lima-Filho, J. L.³, Cavalcanti, M. A⁵ Q., Porto, A. L. F.^{6,*}

¹ *Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE, Brasil;*

² *Centro Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco – CEFETPE Pesqueira, Brasil;*

³ *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA-UFPE;*

⁴ *Departamento de Química Fundamental-UFPE, Brasil;*

⁵ *Departamento de Micologia-UFPE, Brasil;*

⁶ *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE, Brasil.*

Autor para correspondência: * Tel. 0055-81-33206391, Fax: 0055-81-33206057 E-mail

address: eslyra2005@yahoo.com.br/ analuporto@yahoo.com.br

Resumo

Muitos corantes sintéticos e xenobióticos são degradados com dificuldade na natureza, deixando resíduos que provocam danos ao ambiente e a saúde humana. A utilização de fungos, na remoção dos resíduos de efluentes têxteis, tem sido empregada como uma nova alternativa bastante promissora nos processos de descoloração de corantes sintéticos. A descoloração dos corantes Alaranjado II e Preto V pelos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea* foi avaliada, aos seis, doze e dezoito dias, através de um planejamento fracionário, com um total de 16 ensaios, estatisticamente representado por 2^{6-2} . Os fungos foram cultivados em frascos de Erlenmeyer contendo os meios malte e de King acrescido de 0,05% m/v dos corantes Alaranjado II e Preto V, pH 4,5 e 5,0, na presença ou ausência de agitação e/ou luminosidade. As espécies fúngicas mostraram comportamentos diferentes quanto à produção de biomassa e a descoloração dos corantes, sob as diferentes condições de cultivo. *Pycnoporus sanguineus* apresentou maior produção de biomassa (7,5g/L) quando cultivado em meio King acrescido do corante Preto V, sob ausência ou presença de agitação, luminosidade e nos pH 4,5 e 5,0, enquanto *Trametes membranacea* apresentou biomassa de 7,5g/L em todas as condições de cultivo testadas para os dois corantes testados. Quanto à agitação dos frascos, a velocidade de rotação de 130 rpm foi a melhor condição para a remoção da cor. Os fungos estudados atingiram um percentual de descoloração dos corantes superior a 50% em todos os ensaios sob agitação. Os resultados são promissores para a aplicação desses isolados no tratamento de efluentes têxteis.

Palavras-chave – Basidiomycetes, fungos da podridão branca, corantes azos, descoloração, biodegradação

Introdução

A maior parte dos corantes fabricados vai para a indústria têxtil, mas as indústrias de artefatos de couro ou de papel, indústrias alimentícias, de cosméticos, tintas e plásticos também são usuários importantes (Minatti, 2005; Aksu, 2005). Metade dos corantes usados atualmente é do tipo azo (Zanoni e Carneiro, 2001). Os corantes azóicos possuem, em comum, o grupo $-N=N-$, chamado "azo". A reação do ácido nitroso (HONO) com uma anilina $Ar-NH_2$ dá o íon diazônio $Ar-N=N^+$, que rapidamente reage com outras anilinas ou fenóis para formar compostos azóicos (Minatti, 2005).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química – ABIQUIM (2006), os corantes e pigmentos podem ser classificados de acordo com as classes químicas a que pertence e com as aplicações a que se destinam. Por exemplo, a classe química azo pode ser dividida, segundo sua aplicação, em corantes ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes e reativos. Os corantes reativos azos têm sido motivos de grande preocupação ambiental, devido a sua intensa utilização em indústrias têxteis (Balan, 2002) e por serem considerados recalcitrantes e altamente tóxicos, podendo apresentar propriedades carcinogênicas e genotóxicas, quando presentes em qualquer organismo vivo (Allinson e Morita, 1995; Al-Sabti 2000; Guaratini e Zanoni, 2000; Gnanamani et al 2004).

Embora a descoloração seja um processo desafiante tanto para indústria têxtil, quanto para os sistemas de tratamentos de resíduos aquosos, há um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de descoloração microbiológica com mineralização total dos corantes. Neste processo tem se destacado os Basidiomycetes degradadores de madeira (Selvam et al. 2003; Blánquez, et al. 2004; Couto et al. 2004; Kim et al. 2004; Novotny et al. 2004; Kamida e Durrant, 2005; Seys e Aksoz, 2005) por apresentarem forte atividade

oxidativa e baixa especificidade de suas enzimas lignolíticas ao substrato (Ohkuma et al. 2001).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de descoloração dos corantes alaranjado II e preto V por *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea*, sob diferentes condições de cultivos.

Materiais e Métodos

Microrganismos - *Trametes membranacea* e *Pycnoporus sanguineus* coletados e isolados em madeiras da Mata Atlântica - Pernambuco e identificados pela Prfa. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti do Departamento de Micologia da UFPE. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio Agar-malte a 28 ± 2 °C.

Meios de culturas - Foram utilizados os meios de KING (Silva et al., 2003) e Malte (20g/L), em pH 4,5 e 5,5.

Corantes – Foram utilizados os corantes alaranjado II obtido da Sigma e preto V adquirido da indústria Suape Têxtil S/A, Pernambuco. As estruturas químicas estão ilustradas na Figura 1, enquanto as características químicas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas dos corantes utilizados no experimento.

Corantes	Ionização	λ (nm)	Classe química	Fórmula empírica	Peso molecular
Alaranjado II	Ácido	485	azo	$\text{HOC}_{10}\text{H}_6\text{N}=\text{NC}_6$ $\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$	350,32
Preto V	Ácido	595	diazo	$\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_{18}\text{S}_6\text{Na}_4$	975,80

^a Absorção máxima a λ (nm)

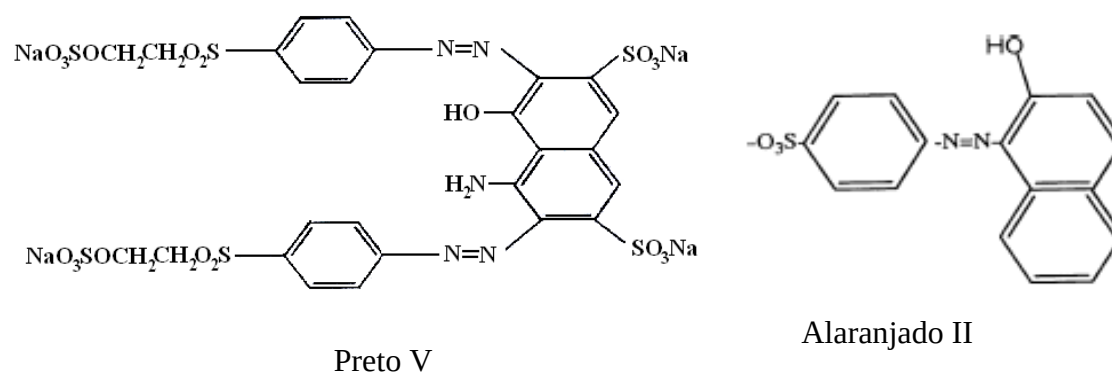


Figura 1. Estrutura química dos corantes utilizados nos experimentos.

Condições culturais

Os isolados fúngicos foram cultivados em placas com meio agar-malte durante 10 dias. Em seguida, 2cm² do micélio de cada isolado foram transferidos separadamente para frascos de Erlenmayer de 125 mL, contendo 30 mL dos meios (Malte e : KING) adicionados de 0,05% m/v de concentração dos corantes alaranjado II e Preto V, sendo incubados a temperatura de 28±2 °C , por 6, 12 e 18 dias. Após esses períodos, o micélio de cada isolado foi separado por filtração em membrana milipore (0,45 µm) e o filtrado obtido foi utilizado para avaliar o grau de descoloração de cada corante. A determinação da biomassa foi estimada por gravimetria, usando a estufa a 70° C até peso constante.

Determinação da redução de cor

A determinação da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Micronal, modelo B582, Brasil). Os comprimentos de ondas utilizados para cada corante estão apresentados na Tabela 01. As concentrações dos corantes foram calculadas de acordo

com a equação: % Descoloração = $(A - B/A) \times 100$, onde, A é a absorvância dos filtrados das culturas após 10 dias de crescimento e B é a absorvância do controle.

Nas Tabela 2 e 3 encontram-se as matrizes contendo as condições do estudo. Como foram 6 variáveis a serem avaliadas e em diferentes níveis, foi realizado um planejamento do tipo fracionário com um total de 16 ensaios (estatisticamente representado por 2^{6-2}).

Análise estatística

Os dados obtidos da descoloração dos corantes foram submetidos a um planejamento fatorial, identificando-se o nível de significância e a interação entre as variáveis respostas: percentual de descoloração do corante e biomassa do fungo (Barros Netos, 2002). Para determinação da redução da cor, foram construídos gráficos de Pareto sobre os efeitos das variáveis analisadas com o auxílio do programa Statistic 6.1 (Statsoft Inc., 2000.)

Tabela 2. Níveis dos fatores utilizados nos estudos de descoloração dos corantes.

<i>Variáveis</i>	<i>Fatores</i>	
Fungos	<i>Trametes membranacea</i>	<i>Pycnopous sanguineus</i>
Meios de Cultivo	Malte	Kings
Agitação (rpm)	0	130
Luz	Ausência	Presença
pH	4,5	5,5
Corante	Alaranjado II	Preto V

Tabela 3: Condições empregadas nos 16 (2^{6-2}) ensaios de descoloração por fungos.

<i>Ensaio</i>	<i>Fungo</i>	<i>Meio</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Luz</i>	<i>pH</i>	<i>Corante</i>
1	<i>T. membranacea</i>	Malte	0	-	4,5	Alaranjado
2	<i>P. sanguineus</i>	Malte	0	-	5,5	Alaranjado
3	<i>T. membranacea</i>	Kings	0	-	5,5	Preto V
4	<i>P. sanguineus</i>	Kings	0	-	4,5	Preto V
5	<i>T. membranacea</i>	Malte	130	-	5,5	Preto V
6	<i>P. sanguineus</i>	Malte	130	-	4,5	Preto V
7	<i>T. membranacea</i>	Kings	130	-	4,5	Alaranjado
8	<i>P. sanguineus</i>	Kings	130	-	5,5	Alaranjado
9	<i>T. membranacea</i>	Malte	0	+	4,5	Preto V
10	<i>P. sanguineus</i>	Malte	0	+	5,5	Preto V
11	<i>T. membranacea</i>	Kings	0	+	5,5	Alaranjado
12	<i>P. sanguineus</i>	Kings	0	+	4,5	Alaranjado
13	<i>T. membranacea</i>	Malte	130	+	5,5	Alaranjado
14	<i>P. sanguineus</i>	Malte	130	+	4,5	Alaranjado
15	<i>T. membranacea</i>	Kings	130	+	4,5	Preto V
16	<i>P. sanguineus</i>	Kings	130	+	5,5	Preto V

(-) ausência; (+) presença

Resultados e Discussão

As espécies fúngicas mostraram comportamentos diferentes quanto à produção de biomassa e a descoloração dos corantes, sob diferentes meios de cultivo, agitação, luminosidade e pH (Tabela 4). *Pycnoporus sanguineus* apresentou maior produção de biomassa (7,5 g/L) quando cultivado em meio King acrescido do corante Preto V, sob ausência ou presença de agitação, luminosidade e nos pH 4,5 e 5,0. No geral, a produção de biomassa por *Trametes membranacea* foi superior em relação à outra espécie, apresentando a biomassa de 7,5g/L em todas as condições de cultivo testadas. De acordo com Moino Jr e Alves (1998), quando o fungo está na presença de um agente tóxico que prejudique o seu desenvolvimento, ele utiliza todo seu esforço reprodutivo, aumentando a sua taxa de crescimento micelial e, conseqüentemente, sua biomassa.

Na maioria dos ensaios analisados houve relação diretamente proporcional entre biomassa e descoloração dos corantes pelos fungos, ou seja, o aumento de biomassa fúngica refletiu-se no aumento da capacidade de descoloração dos meios contendo os corantes. Contudo, Maziero et al. (1999) não observou tal relação entre a biomassa dos basidiomycetes por eles estudados.

Os dois isolados fúngicos foram eficientes na remoção da cor do Alaranjado II na primeira semana de crescimento, alcançando valores variando de 70% a 98% nas diferentes formas de cultivo, exceto quando foram cultivados em meio malte, sem agitação e sem luz, apresentando percentuais de remoção da coloração inferiores a 42%. Quanto a descoloração do Preto V, *P. sanguineus* e *T. membranacea* foram eficientes apenas quando cultivados em meio malte, sob agitação de 130rpm, na presença ou não da luz e no pH 5,5, atingindo valores de até 89% e 95%, respectivamente, na redução da cor do corante. Resultados semelhantes

foram obtidos por Novotný et al (2004), ao avaliarem a capacidade do fungo *Irpex lacteus*, após duas semanas de crescimento, em descolorir meio líquido contendo o corante Preto V, sob diferentes condições de cultivo. Tychanowicz et al. (2004) correlacionaram a habilidade do fungo da podridão branca *Pleurotus pulmonarius* para descolorir corantes industriais com sua produção de fenoloxidasas.

Tabela 4 Avaliação do percentual de descoloração dos corantes alaranjado II e preto V e biomassa de *T. membranacea* e *P. sanguineus*.

Ensaio	DT1	BT1 (g/L)	DT2	BT2 (g/L)	DT3	BT3(g/L)
1	41	2,5	61	5,0	74	5,0
2	18	2,5	43	5,0	51	5,0
3	24	2,5	36	7,5	43	7,5
4	29	2,5	57	2,5	86	7,5
5	95	2,5	97	5,0	97	7,5
6	89	2,5	96	2,5	97	5,0
7	70	5,0	91	5,0	92	7,5
8	94	2,5	96	5,0	97	5,0
9	37	2,5	79	5,0	87	7,5
10	50	2,5	62	5,0	79	5,0
11	80	2,5	90	7,5	94	7,5
12	91	2,5	91	2,5	91	2,5
13	98	5,0	99	7,5	99	7,5
14	96	2,5	97	5,0	98	5,0
15	50	5,0	67	5,0	78	7,5
16	50	2,5	57	5,0	93	7,5

DT1(Descoloração no Tempo 1) = 6 dias; DT2(Descoloração no Tempo 2)= 12dias;
DT3(Descoloração no Tempo 3)= 18 dias

BT1 (Biomassa no Tempo 1); BT2 (Biomassa no Tempo 2); BT3 (Biomassa no Tempo 3).

Os gráficos de Pareto (Figuras 2 e 3) representam os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre o percentual de descoloração dos corantes em ordem de magnitude, no sexto e décimo segundo dia após incubação. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes, ou seja, as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95%.

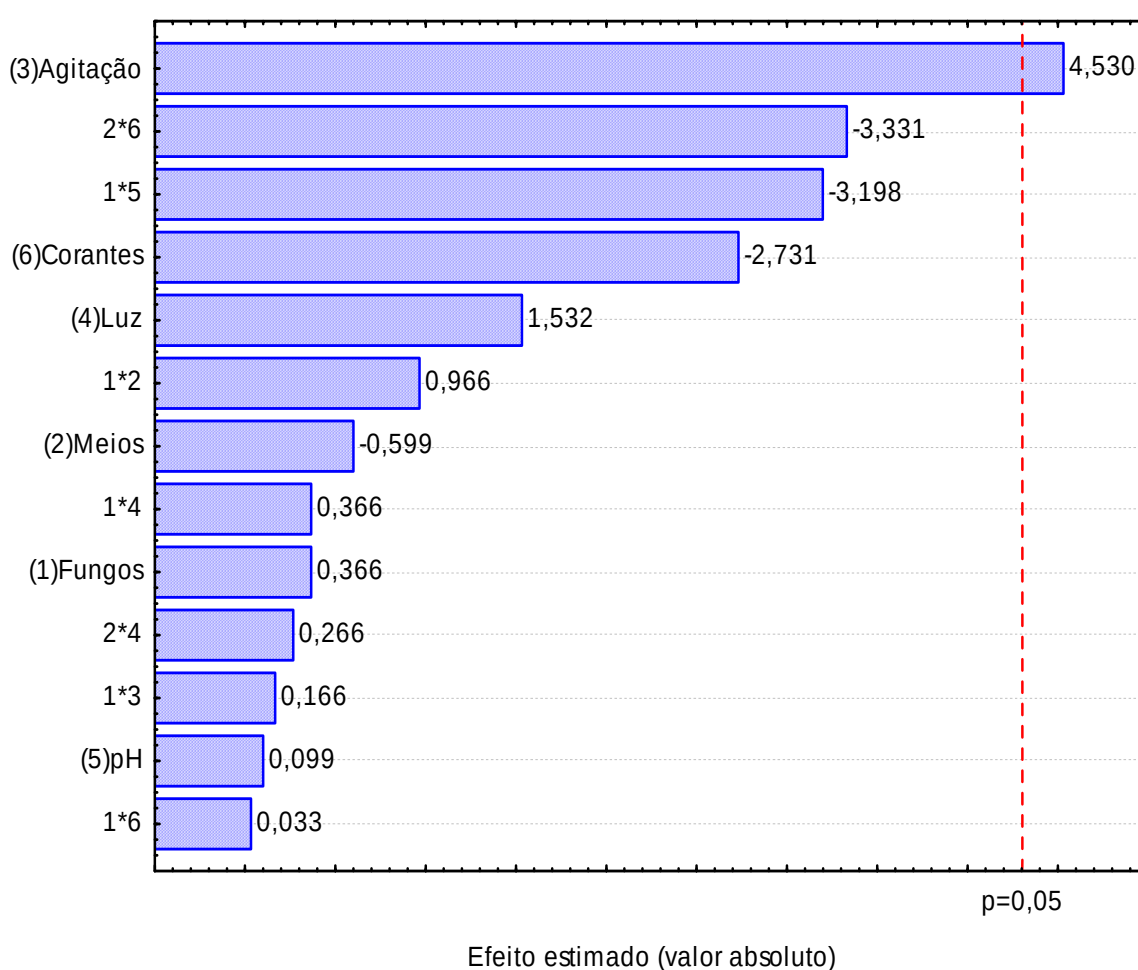


Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos sobre a resposta descoloração no 6º dia de crescimento.

Observa-se, na Figura 2, a significância ($P=0,05$) das seis variáveis trabalhadas no planejamento fracionário, assim como as interações entre eles. As variáveis e suas interações estão representadas por siglas e números no eixo vertical. A análise das interações entre as variáveis mostrou que a agitação foi o único efeito aditivo significativo sobre o percentual de descoloração dos corantes no 6º dia, independente do isolado testado. De acordo com Tuor et al. (1995), a aeração é uma das condições ambientais que pode interferir na ação enzimática dos fungos degradadores de madeira, aumentando sua eficiência na redução da cor do corante.

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 chrisosporium*, *T. versicolor* e *Bjerkandera* quando submetidos a agitação. O mesmo foi relatado por Ge et al. (2004) ao submeterem *Phanerochaete sordida* ao aumento da velocidade rotacional (rpm). As condições culturais podem afetar a fisiologia e metabolismo do fungo, ativando suas enzimas.

Na Figura 3, as variáveis agitação e corantes apresentaram isolados ou associadas, efeitos aditivos significativos sobre a remoção da cor dos corantes utilizados no décimo segundo dia de crescimento. Avaliando-se a variável agitação, verifica-se que seu efeito foi positivo e isto significa que a agitação dos frascos a 130 rpm foi a melhor condição para a degradação dos corantes no 12º dia de crescimento. Em relação a segunda variável (corantes), também foi observado efeito significativo, indicando que o meio de cultivo interfere no percentual de descoloração dos corantes pelos fungos selecionados. Quando as duas variáveis estão associadas (aeração e o meio de cultivo), o efeito interativo é o maior possível. Efeito sinérgico sobre o percentual de remoção da cor de corantes sintéticos foi observado com fungos da podridão branca, *Bjerkandera adusta*, *Lentinus edodes*, *Geotrichum candidum*,

Pleurotus ostreatus, *P. saca*, *P. eringii*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, sob agitação de 94 rpm (Mohorcic et al. 2005).

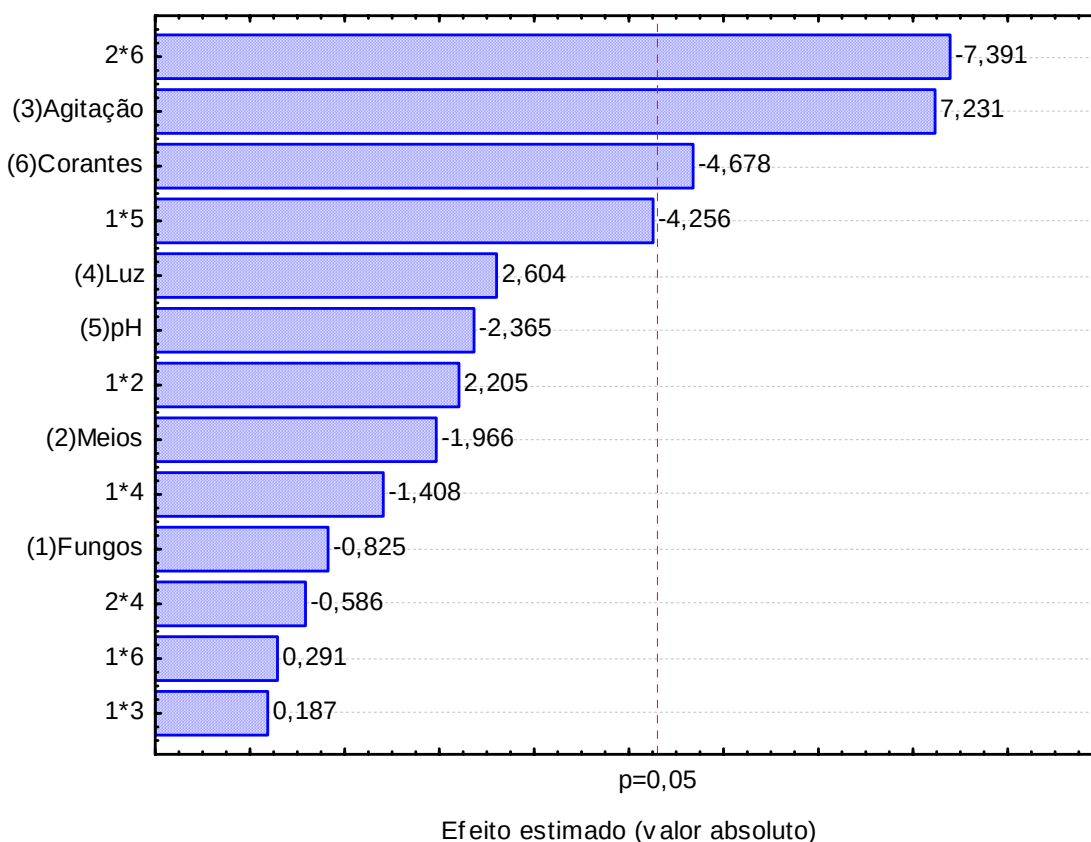


Figura 3. Gráfico de Pareto dos efeitos sobre a resposta descoloração no 12º dia de crescimento.

A interação entre as variáveis, meios de cultivo e tipos de corantes, apresentou efeito significativo. Isto quer dizer que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, o seu efeito depende da outra variável. Este efeito de interação é mais evidente nos gráficos de interpretação geométrica da Figura 4. Observa-se que o corante Preto V foi mais bem descorado quando os fungos cresceram no meio malte. Quanto ao alaranjado II, nos dois meios em que os fungos foram cultivados, apresentaram elevadas capacidades degradativas sobre o corante, entretanto no meio de King ocorreu a otimização desse processo.

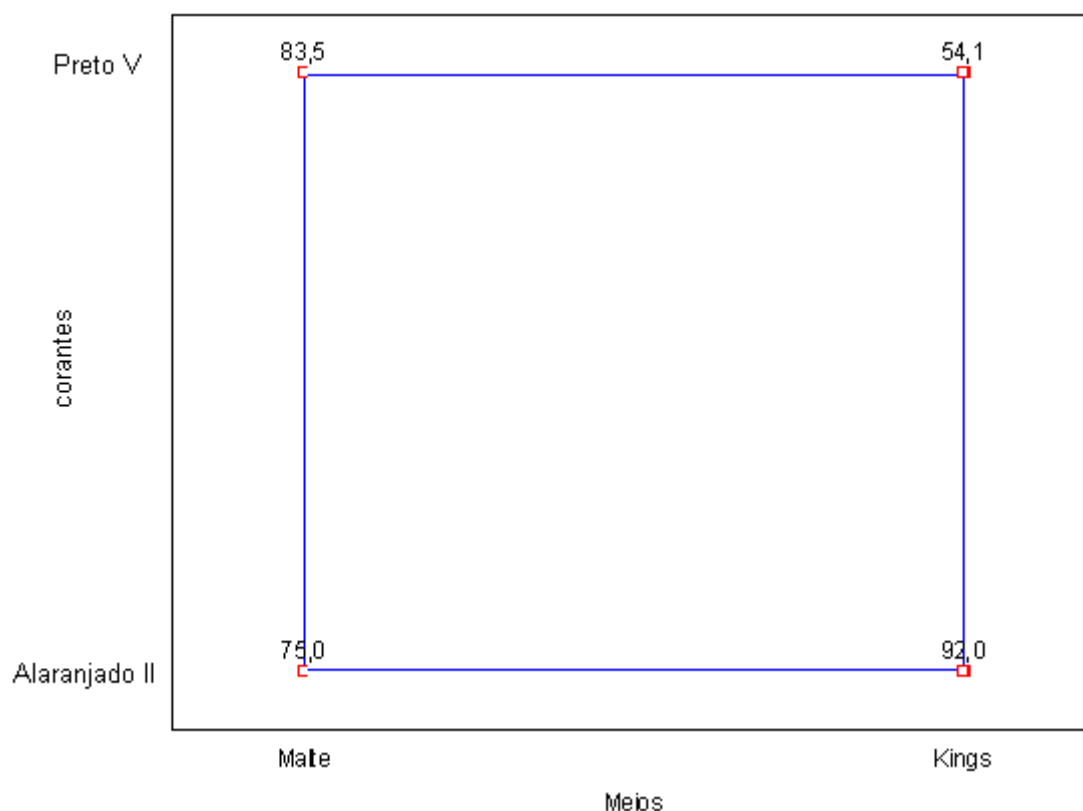


Figura 4. Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento (2^{6-2}) no 12º dia de crescimento.

As biomassas dos fungos estudados também foram avaliadas, mas para esta variável a interação não foi significativa, indicando que não houve correlação entre o aumento da biomassa do fungo e a degradação do corante. No 18º dia de crescimento, apesar de ter ocorrido aumento do percentual de descoloração, não houve aumento significativa para as duas respostas (percentual de degradação e biomassa). Entretanto, Yonni et al. (2004) constatou uma relação entre a biomassa fúngica e a atividade enzimática da Manganês Peroxidase (MnP), observando uma relação diretamente proporcional entre a produção enzimática e o aumento da biomassa em fungos da podridão branca.

Referências

Associação Brasileira da Indústria Química – ABIQUIM. **Corantes e pigmentos**. 2006.

Disponível em: < http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_classificacao.asp > Acesso em: 02 jan. 2006.

Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry** 40: 997–1026.

Allinson, G.; Morita, M. 1995. Bioaccumulation and toxic effects of elevated levels of 3, 3', 4, 4'-tetrachloroazobenzene (33'44'-tcab) towards aquatic organisms. In: bioaccumulation and toxic effects of dietary 33'44'-tcab on the japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere** 30:223-232.

Al-Sabti, K. 2000. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 47:149-155.

Balan, D.S. L. 2002. Biodegradação e toxicidade de efluentes tóxicos. **Revista ABTT** (Edição de lançamento), p.16-19,

Blánquez, P.; Casas, N.; Font, X.; Gabarrell, X.; Sarrá, M.; Caminal, G.; Vicent, T. 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. **Water Research** 38: 2166–2172.

- Couto, S.R.; Rosales, E.; Gundin, M.; Sanromán, M.Á. 2004. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **Journal of Food Engineering** 64: 423-428.
- Ge, Y.; Yan, L.; Qinge, K. 2004. Effect of environment factors on dye decolorization by *Phanerochaete sordida* ATCC90872 in a aerated reactor. **Process Biochemistry** 39:1401–1405.
- Guaratini, C. C. I.; Zandoni, M. V. B. 2000. Corantes têxteis. **Química Nova** 23: 71-78.
- Kim, T.; Lee, Y.; Yang, J.; Lee, B.; Park, C.; Kim, S. 2004. Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. **Desalination** 168:287-293.
- Kamida, H. M.; Durrant, L. R. 2005. Biodegradação de efluentes têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova** 28: 629-632.
- Maziero, R.; Cavazzoni, V.; Bononi, V. L. R. 1999. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia** 30: 77-84.
- Minatti, E. (Edi). Corantes – a química das cores. **Revista Eletrônica de Química**. Ano 4. Disponível em: <<http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>> Acesso em: 18 jan. 2005.

Moino Júnior, A & S. B. Alves. 1998. Efeito de idacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica Brasileira, 27: 611-619.

Novotny, C.; Svobodová, K.; Kasinath, A.; Erbanová, P. 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. **International Biodeterioration e Biodegradation** 54: 215 – 223.

Ohkuma, M.; Maeda, Y.; Johjima, T.; Kudo, T. 2001. Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. **Focused on Ecomolecular Science Research** s/v: 39-42.

Swamy, J.; Ramsay, A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology** 24:130–137, 1999.

Seys, I; Aksoz, N. 2005. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **International Biodeterioration e Biodegradation** 55:115-119.

Selvam, K., Swaminathan, K., Chae, Keon-Sang. 2003. Microbial decolorization of azo dyes and dye industry effluent by *Fomes lividus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 19: 591-593.,

- Tychanowicz, G. K.; Zilly, A.; Souza, C. G. M.; Peralta, R. M. 2004. Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry** 39: 855–859.
- Tuor, U.; Winterhalter, K.; Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal Biotechnology** 41:1-17.
- Yonni, F.; Moreira, M. T.; Fasoli, H.; Grandi, L.; Cabral, D. 2004. Simple and easy method for the determination of fungal growth and decolourative capacity in solid media. **International Biodeterioration e Biodegradation** 54: 283 – 287.

4- CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

Capítulo I

- Os fungos da podridão branca representaram a maioria das espécies coletadas e isoladas (96,7%) no Parque de Dois-Irmãos;
- Os fungos da podridão branca, com exceção de *Ganoderma stipitatum*, apresentaram melhor resposta ao teste fenoloxidase que os da podridão marrom.
- As espécies *Trametes membranacea*, *Pycnoporus sanguineus* e *Earliella scabrosa* apresentaram maior potencial enzimático.
- O comportamento enzimático da maioria dos isolados foi promissor, sugerindo a sua aplicação na biorremediação.

Capítulo II

- As espécies *Earliella scabrosa*, *Hexagonia hydroides*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea* apresentaram boa capacidade degradativa em relação aos corantes estudados, sugerindo sua aplicabilidade para o tratamento de resíduos industriais;
- A descoloração de corantes pode ser utilizada como parâmetro para selecionar os fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas;
- Os isolados, excetuando-se *E. scabrosa*, não foram eficientes no processo de descoloração do vermelho-de-fenol;
- O azul de bromofenol foi mais bem degradado por *P. sanguineus*, *H. hydroides*, *Earliella scabrosa* e *Trametes membranacea*;
- O corante verde metil foi melhor degradado por *Caripia montagnei*, *Earliella scabrosa* e *Trametes membranacea*;
- *Earliella scabrosa* apresentou melhor capacidade degradativa em relação aos corantes estudados.

- *Ganoderma stipitatum* e *Pleurotus ostreatus* apresentaram menor capacidade degradativa dos corantes com exceção do vermelho congo com percentual acima de 50%.

Capítulo III

- Independente do meio e das condições de cultivo, *Trametes membranacea* teve maior produção de biomassa que *Pycnoporus sanguineus*;
- *Trametes membranacea* e *Pycnoporus sanguineus* foram eficientes em remover o corante alaranjado II presente meio malte e/ou de King, com agitação e luminosidade, alcançando valores de 99% e 98%, respectivamente;
- As variáveis luminosidade e pH não interferiram de modo significativo na degradação dos corantes;
- A variável agitação teve efeito positivo sobre a degradação dos corantes;
- O corante alaranjado II foi mais bem descolorado no meio King, enquanto o preto V foi melhor no meio malte;
- Os fungos testados mostraram-se eficientes na degradação dos corantes azos, podendo ser aplicados em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

Anexos

CAPÍTULO II

Instructions for Authors

World Journal of Microbiology and Biotechnology

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles.

Instructions to Authors

The World journal of Microbiology & Biotechnology welcomes research papers, short communications, short notes, technical communications and review papers.

Full-length Research Papers:

These should describe new and carefully confirmed findings. Experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications:

A Short Communication is suitable for recording the results of complete but small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. Short communications are two printed pages in length. Progress reports are not acceptable.

Short Notes:

Short Notes are one printed page in length. They are suitable for reports of simple findings such as the properties of an already well described enzyme or of observations not requiring elaboration. They should be written with a short (40-word) summary, no main subdivisions, they may contain one table or figure, or two if the text is brief, and no more than three references.

Technical Communications:

These are reports of processes or procedures which may be published as an annex to a full-length paper or on their own provided that the work described is of sufficient interest to other workers in the field.

Review Papers:

These should be submitted only after consultation with the Editor. They will be limited to no more than 8 printed pages.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journal website at <http://www.springer.com>. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your first language please ensure that the language is corrected by a fluent English speaker or via www.manuscript-improvement.com before submission. Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review. Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving 2.5 cm margins on all sides of the text. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Summary

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. It should be page 2 of the manuscript with the title repeated on that sheet.

Key Words Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations should be explained at first occurrence in the text though extensive mathematical symbols should be defined collectively before the introduction begins on page 3. A list of abbreviations which need not be defined is given in Table 1 at the end of this document.

Main text

Presentation of the main text depends on the type of article. For guidance on this respect you should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journals' website at www.springeronline.com. Sections headings should be clearly distinguishable but not numbered. If you decide to use notes, please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the references. Please consult a current issue for the styles.

References are cited in the text by giving the name(s) of the author or authors up to two and the year. When there are more than two authors, only the first author's name should be given followed by et al. In the event that a cited author has two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a, b etc. after the date to distinguish the works.

Full-length Research papers should be presented under the following headers: Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), Materials & Methods (with sufficient detail to allow the work to be repeated), Results & Discussion (focus the reader's attention on your key results and put your key results into the context of current information) and Conclusions (please avoid unwarranted or unsupported speculations).

The style of main sections of Short Communications need not conform to that of full-length papers. However, we encourage authors to present the main text under the following headers: Introduction, Materials & Methods, Results & Discussion and Conclusions.

Acknowledgements

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should follow the main text and precede the references.

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Attwood, T.K. & Parry-Smith, D.J. 1999 Introduction to Bioinformatics. pp. 69–80. Harlow: Addison Wesley Longman. ISBN 0–582–32788–1.

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Steinbuchel, A. 1996 PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In *Biotechnology*, 2nd edn, Vol 6, ed. Rehm, H.–J. Weinheim: VCH Publishers.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Charnley, A.K. 1992 Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin*, ed Lomer, C.J. & Prior, C. pp. 181–190. Oxford: C.A.B. International. ISBN 0–5198779–6.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Saha, B.C. & Zeikus, J.G. 1989 Improved method for preparing high maltose conversion syrups. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 299–303.

References to technical reports or doctoral dissertations, which must be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Singh, K.L. 1997 Physiological and biochemical studies on microbes isolated from the harsh conditions. Ph.D Thesis, BHU, Varanasi, India.

Figure Legends

Figure legends should follow the references on a separate page and precede the tables. Each figure should be mentioned in the text.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Please provide a short explanatory caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript. In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multipart figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Policy on Colour Figures:

Springer treats the inclusion of color figures on a per article basis and offers two options 1) Free Online Color, the color figures will only appear in color on the journals' website and b/w in the printed version of the journal 2) Online and Printed Color which comes at a charge of Euro 950/ USD 1150 per article. The color figures will appear in color on the website and in the printed version of the journal.

Symbols and Units

Only recommended SI units should be used. Authors may use either superscript presentations (mg ml^{-1}) or the solidus (/) presentation (mg/ml).

When giving the concentration of a solution in a solvent the correct description is, for example, 10 g glucose/100 ml, not 10 g/100 ml glucose. The term % used to express a concentration must be used correctly, i.e. g per 100 g solution; otherwise % (v/v) or % (w/v) should be used for solutions of concentration greater than 1%. For solvent mixtures use, for example, butan-1-ol/acetic acid/water (4:1:1, by vol.) or chloroform/methanol (2:1, v/v).

Chemical and biochemical nomenclature should follow the IUPAC–IUB Commission guidelines; appropriate guidelines are given in, for example

Policy of the Journal and Instructions to Authors

The Biochemical Society
59 Portland Place
London W1N 3AJ

and references therein. This document is available online at (Please use the link below). The Enzyme Commission (EC) number for enzymes should be given at the first time of mention; see *Enzyme Nomenclature* (1992), Academic Press; London & New York, or visit

Microorganisms must be correctly named using the current codes for bacteria, yeasts, fungi, algae and protozoa; (see *Microbiology* 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication. For further information on quantities and units, see Table 2 at the end of this document.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours!

Corrections should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@springer.com.

Always quote the four-letter journal code and article number from your proof in the subject field of your e-mail.

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge

No page charges are levied on authors or their institutions.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher (see section Manuscript Submission). This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Manuscript Submission

The World Journal of Microbiology and Biotechnology has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

For manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

For figures - TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT

PDF is NOT a recommended format.

Manuscripts should be submitted to: <http://wibi.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system.

Please send a completed and signed form either by mail or fax to the World Journal of Microbiology and Biotechnology Office.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar. The conventional way of submitting your manuscript (e.g. mailing printout + disk) is NOT possible.

Submitted manuscripts should not be in consideration in whole or in part by another journal. Nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

IMPORTANT: Please supply the names in the Enter Comments box of Editorial Manager of not less than three suitably qualified persons whom the editors might wish to consider as possible reviewers of your manuscript.

Table 1

Abbreviations and Conventions. These abbreviations may be used without definition.

Tabela 1

PPO

2,5-diphenyloxazole

Mike van den Bosch, PhD
Publishing Editor
Springer
P.O. Box 17
3300AA Dordrecht
The Netherlands

CAPÍTULO III

International Biodeterioration and Biodegradation

Guide for Authors

Submission of papers

Submission of a manuscript implies that the author(s) have the authority to publish the work and that it is not being considered contemporaneously for publication elsewhere. Submission of a multi-authored manuscript implies the consent of all the participating authors. All papers will be independently refereed.

All manuscripts should be submitted to the Editor-in-Chief, Dr Brian Flannigan, SCPS School of Life Sciences, Napier University, Colinton Road, Edinburgh, EH10 5DT, UK. Fax no. 0044 131 455 2291, e-mail: brian@biomerc.fsnet.co.uk.

Types of contribution

Original papers; review articles; case studies; short communications; reports of conferences and meetings; book reviews, and news of forthcoming meetings. The subject and content of review articles should be discussed with the Editors prior to submission to the journal. All papers should be written in English.

Format of manuscripts

Authors may submit three copies of their manuscript together with a disk version, but electronic submission by e-mail is actively encouraged. Wherever possible, authors should consult a recent issue of the journal for style and layout. Manuscripts that do not conform to the style of the journal or in which the English is poor may be returned to authors before they are accepted for reviewing. It is in the interests of authors who are not familiar with the correct use of English to have someone proficient in the English language check their manuscript before it is submitted. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

The manuscript should be prepared on a word-processor, in double-spaced typing on pages of uniform size with a 2.5 cm margin all round. Artificial (hyphenated) word breaks should not be used at the end of lines. Footnotes to the text should be avoided. All pages should be numbered consecutively.

The first page of the manuscript should give:- title of the paper; name(s) of author(s); address(es); name, full post address, e-mail address, and telephone and fax numbers of the corresponding author, to whom page proofs will be sent. On the first page the author also needs to state what the scientific relevance of the paper is. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication.

In general, the manuscript should not exceed 10 000 words, or about 20 printed pages. It should comprise the following sections:

Abstract. A summary consisting of about 150-200 words reporting concisely on the purpose and results of the work described. It should be followed by up to five keywords.

Introduction. This should give (a) a salient background to enable the reader to understand and assess the study presented and (b) a statement of the aims of the study.

Materials and Methods. Enough technical information should be given in this section for the experimental work to be repeated. New methods should be described fully, but for established methods reference to published papers or readily available manuals is adequate.

Results. Results should be presented as concisely as possible. Use should be made here of well constructed Tables and Figures. The text here should not be used to reiterate or discuss the results presented in Tables and Figures, but should direct the attention of the reader to the important findings in them. Data should not be presented in Tables and Figures where they can be more concisely set down in the text.

Discussion. This section should interpret and discuss the results in the light of previous work; it should not repeat at length material presented in the Introduction or Results. The Results and Discussion sections may be combined in Short Communications.

Acknowledgements.

References. Following the Harvard system, there should be a list of references in alphabetical order at the end of the paper. All

references in this list must be cited in the text, and vice versa. The references should be indicated at the appropriate place in the text using surnames and year of publication, as in Canale-Parola (1992), Eaton and Hale (1993), and for three or more authors Bjordal et al. (2000). Where in a series, references should be in ascending order of year, as in (Daniel and Nilsson 1986; Canale-Parola 1992; Eaton and Hale 1993; Bjordal et al. 2000). Where two or more papers by the same author(s) are published in the same year they should be cited as Smith (1995a), Smith (1995b), etc. When together in parentheses they should appear as (Smith 1992a,b). Each reference in the list should give names and initials of ALL authors, the year and the exact title of the paper or book. For journals there should follow the full title, volume number (but not part number), and initial and final page numbers of the article; for books there should follow the name of the publisher and place of publication. The style for contributions to edited books and proceedings, reports and online articles are shown below.

Bjordal, C.G., Daniel, G., Nilsson, T., 2000. Depth of burial, an important factor in controlling bacterial decay of waterlogged archaeological poles. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45, 15-26.

Eaton, R.A., Hale, M.D.C., 1993. *Wood - decay, pests and protection*. Chapman and Hall, London.

Dillon, H.K., Heinsohn, Miller, J.D., (Eds.), 1996. *Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples*. American Industrial Hygiene Association, Fairfax, VA.

Adan, O.C.G., 1994. On the fungal defacement of interior finishes, PhD thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, The Netherlands.

Canale-Parola, E., 1992. Free-living saccharolytic spirochetes: The genus *Spirochaeta*. In: Balows, A., Truper, M., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., (Eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.), Vol. 4, Springer-Verlag, New York, pp. 3524-3536.

Huang, S.J., Bell, J.P., Knox, J.R., Atwood, H., Bansleben, D., Bitritto, W., Broghard, W., Chapin, T., Leong, K.W., Natarjan, K., Nepumuceno, J., Roby, M., Soboslai, J., Shoemaker, N., 1976. Design, synthesis and degradation of polymers susceptible to hydrolysis by proteolytic enzymes. In: Sharpley, J.M., Kaplan, A.M., (Eds.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*, Applied Science, London, pp. 731-741.

Daniel, G., Nilsson, T., 1986. Ultrastructural observations on wood-degrading erosion bacteria. IRG/WP/1283. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Carey, J., Grant, C., 2002. The treatment of dry rot in historic buildings. Cathedral Communications Ltd, online at <http://www.buildingconservation.com/articles/rot/rot.htm>.

Unpublished data or private communications should not appear in the reference list. References to unpublished data will only be accepted at the discretion of the Editors.

Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used. Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in scientific abbreviations such as h (not h.), m (not m.), ppm (not p.p.m.); '%' should be used in preference to 'per cent'; 'per', as in mg per liter, should be written in exponential notation as mg l⁻¹ (not mg/l). Where abbreviations are likely to cause ambiguity or cannot be readily understood by an international readership, units should be given in full. Greek symbols and unusual symbols used for the first time should be defined by name in the left-hand margin.

Abbreviations

Abbreviations of chemical or other names should be defined when first mentioned, unless the abbreviation is commonly used and internationally known and accepted, e.g. ATP, DNA, EDTA, GC-MS, GLC, HPLC, IU (International Unit). For approximately, use approx. or c. (not ca.); for versus, use vs (not v.); for the statistical terms standard deviation, standard error and standard error of the mean, use SD, SE, and SEM without definition.

Nomenclature

Authors should check all chemical, biochemical and microbiological names before submission of the manuscript. Chemical Abstracts should be consulted for names of chemical compounds; The Merck Index, 13th ed., 2001, is a useful alternative source. For biochemicals, the Compendium of Biochemical Nomenclature and Related Documents, published for The Biochemical Society, London, by Portland Press (1992), should be consulted. Enzymes should be given the (trivial) names in Enzyme Nomenclature (Academic Press, 1992) as recommended by the International Union of Biochemistry and the assigned EC number appended. Latin binomials should be used for all organisms other than man and farm stock. At first mention in both the Abstract and the main body of the text the full names should be given, as in *Mangifera indica*, and thereafter abbreviated by using only the initial letter of the generic name, as in *M. indica*. Where several genera have the same initial letter and abbreviation of the generic names might cause confusion, the full generic name should be retained. For common generic names in bacteria, the abbreviations standardly used, e.g. Staph., Ser. and Strep. For *Staphylococcus*, *Serratia* and *Streptococcus*, should be employed. For the correct spelling of bacterial names, authors should consult Bacterial Nomenclature Up to Date <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> or List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr>. For fungal names, the Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> or

Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition (Commonwealth Agricultural Bureaux International, Egham, Surrey, 1995) should be consulted.

Tables and figures

Each table and figure should each be on a separate page placed at the end of the paper, after the References. They should be numbered in the order in which they are cited in the text. The original and two copies, which may be of a reduced size, of each figure should be provided. Line drawings may be submitted in any medium providing that the image is black and very sharp. They should preferably all require the same degree of reduction; owing to handling difficulties, large diagrams (more than four times final size) are discouraged. The type area of the journal is 176 mm wide x 242 mm deep, and lettering should therefore be large enough to be legible after reduction of the illustration to fit (ideally 7pt lettering after reduction). Photographs should be submitted as contrasting black-and-white prints on glossy paper. The number of each illustration must be written clearly on the reverse side together with the name(s) of the author(s) of the paper. The figure number and legend should not appear on the figure, but should be included in a separate list.

For a guide on electronic artwork please visit: <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Disk submission

Authors are encouraged to submit a computer disk containing the final version of their papers along with the final manuscript to the editorial office. Please observe the following criteria:

- (1) Send only hard copy when first submitting your paper;
- (2) When your paper has been refereed, revised if necessary and accepted, send a disk containing the final version with the final hard copy. Make sure that the disk and the hard copy match exactly;
- (3) Specify what software was used, including which release, e.g. WordPerfect 5.1;
- (4) Specify what computer was used, either IBM compatible PC or Apple Macintosh;
- (5) Include the text file and separate table and illustration files, if available;
- (6) The file should follow the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal;
- (7) The file should be single-spaced and should use the wrap-around end-of-line feature, i.e. no returns at the end of each line. All textual elements should begin on the left: no paragraph indents. Place two returns after every element such as title, headings, paragraph, figure and table call-outs;
- (8) Keep a back-up disk for reference and safety.

Note: Papers can be submitted by e-mail, preferably in Microsoft Word and Excel. If there are any photographic plates, they should at a resolution of no greater than 600 dpi in JPG files.

For further guidelines on electronic submission please visit: <http://authors.elsevier.com> (click on "Guide to Publishing with Elsevier" in the right-hand column).

Language editing

Information on author-paid and pre-accept language editing services available to authors can be found at <http://authors.elsevier.com/LanguageEditing.html>.

Proofs

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

Page charges and offprints

There will be no page charges. Twenty-five offprints of each paper will be supplied free of charge. For review articles one hundred reprints will be supplied free of charge. Additional copies can be ordered at current printing prices.

Online Publication

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09648305>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Services

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the 'Track a Paper' feature of Elsevier's <http://authors.elsevier.com> Author Gateway.

Checklist

Before submission, authors should ensure that they:

- Double space all text, including references and legend for Tables and Figures, in hard copy, or single space in electronic copy.
- Number all pages.
- Check that all references cited in the text are included in the Reference section and are in the style adopted for the journal

- Enclose three copies of the manuscript
- Enclose one separate set of original Figures marked on the reverse in pencil with the first author's name, the Fig. No. and "INBI"
- Enclose three copies of any papers (or one if submitting electronically) that are important for the understanding or judgment of the submitted manuscript, but which have either been submitted or are in press and are not yet published
- Enclose if desired the names of up to three potential referees.
- Enclose a cover letter giving the complete mailing address, the e-mail address, and telephone and fax numbers of the corresponding author.