

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E
EDUCAÇÃO

LAURA RODRIGUES MUNHOZ PERES

ANALISANDO A EFICÁCIA DE DEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO
CONGO PELO FUNGO *Pyricularia oryzae*

ARARAS – SP

2024

Laura Rodrigues Munhoz Peres

Analisando a eficácia de degradação do corante Vermelho Congo pelo fungo
Pyricularia oryzae

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Graduação em Licenciatura
em Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de São Carlos,
Campus de Araras, como requisito para
a obtenção do título de Licenciatura em
Ciências Biológicas.

Orientador: Renato Nallin Montagnoli

Araras – SP

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram nos meus projetos e nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente que me sustentou em toda essa jornada acadêmica e continuara me sustentando ao longo do meu futuro profissional.

Aos meus pais por sempre me apoiarem nas minhas decisões e sempre torcerem pelo meu sucesso.

A minha querida amiga Barbara por ser uma grande amiga que me apoiou desde o primeiro dia que me conheceu e sempre estar do meu lado me ajudando em momentos que eu mais precisava.

As minhas amigas Julia e Verônica por sempre tornarem a vida mais leve e fazer com que a faculdade não fosse só provas e aprovações e sempre torcerem por mim mesmo de longe.

Aos meus amigos e colegas do laboratório LAMAM, em especial Liz, Israel, Judi e Neto, por toda ajuda que me deram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A Nicolly por ser uma boa companheira de apartamento e ter feito a minha estadia em Araras nesses cinco anos serem boas.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, os quais vou levar em meu coração pelo resto da vida.

Aos meus amigos da igreja que acompanharam as minhas dificuldades no fim do curso e estavam orando por mim.

A Universidade Federal de São Carlos por todas as oportunidades que me foram dadas.

A todos os professores os que tive oportunidade de conhecer durante a graduação e que contribuíram para a minha formação e por todo o conhecimento compartilhado, em especial os professores Renato e Alfredo.

“Tudo que amei, amei sabendo que acabaria”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do corante Vermelho Congo	15
Figura 2 – Ação de degradação da enzima lacase sobre o corante Vermelho Congo	23
Figura 3 – Meio de cultura líquido BDA com corante Vermelho Congo	28
Figura 4 – Meio de cultura sólido BDA com corante Vermelho Congo	29
Figura 5 – Placas com meio de cultura BDA com halos visíveis	30
Figura 6 – Placa para medição de absorbância	31
Figura 7 – Comparação dos ensaios de meio de cultura líquido	31
Figura 8 – Sorção do corante pela isoterma de Langmuir	33
Figura 9 – Sorção do corante pela isoterma de Freundlich	33
Figura 10 – Amostras no processo de análise enzimática	35
Figura 11 – Comparação dos ensaios na análise enzimática	36

RESUMO

Os corantes azo predominantemente utilizados nos processos da indústria têxtil, representam riscos ambientais e para a saúde dos seres vivos devido a sua toxicidade e persistência no ambiente. Sua complexa estrutura sintética os torna resistentes aos métodos convencionais de mitigação de resíduos, como a degradação, necessitando de tratamento especial em efluentes e solos contaminados. Neste trabalho, é proposta a análise de biodegração e bioissorção do corante Vermelho Congo utilizando o fungo *Pyricularia oryzae*, o qual é conhecido como fitopatogênico na agricultura por ser causador da doença da Brusone nas culturas de arroz, aveia, trigo e triticale. As análises foram realizadas utilizando meios de cultura líquido e sólido para avaliar o potencial de degradação do corante pelo fungo. Para o isolamento do fungo em contato com o corante foram utilizados meios de cultura BDA com a adição de 10, 50 e 100 mg/L de Vermelho Congo. Os tubos de ensaio com meio líquido foram mantidos em um *shaker* por 7 dias em uma temperatura de 30°C na velocidade de 150 rpm. Os meios sólidos foram mantidos em incubação em uma temperatura de 30°C por 7 dias. Embora a visualização de halos indicativos de degradação do corante tenha sido um desafio em meio sólido devido ao rápido crescimento e intensa pigmentação do fungo, foram observados halos discerníveis a uma concentração de 10 mg/L. Tanto em meios sólidos como líquidos, foi alcançada uma descoloração substancial em concentrações de 10 e 50 mg/L, com atividade diminuída observada em 100 mg/L, sugerindo uma melhor análise de adsorção pelas isotermas de Langmuir e Freundlich, a qual a ação de bioissorção se aplica melhor no modelo Langmuir. Por fim, a realização da análise de atividade enzimática da enzima lacase foi realizada com a finalidade de verificar o potencial dessa enzima, no entanto ocorreu baixa atividade enzimática para a degradação deste corante fazendo com que o desempenho da lacase não conseguisse oxidar o Vermelho Congo nas concentrações maiores de 10 mg/L.

Palavra-chave: biodegradação; corante sintético; biorremediação; degradação.

ABSTRACT

Azo dyes, predominantly used in textile industry processes, pose environmental risks and to the health of living beings due to their toxicity and persistence in the environment. Their complex synthetic structure makes them resistant to conventional waste mitigation methods, such as degradation, requiring special treatment in effluents and contaminated soils. This study proposed to analyze the biodegradation and biosorption of the Congo Red dye using the fungus *Pyricularia oryzae*, which is known as a phytopathogenic in agriculture as it causes blast disease in rice, oat, wheat and triticale crops. Analyzes were carried out using liquid and solid culture media to evaluate the potential for degradation of the dye by the fungus. To isolate the fungus in contact with the dye, PDA culture media was used with the addition of 10, 50 and 100 mg/L of Congo Red. The test tubes with liquid medium were kept in a shaker for 7 days at a temperature of 30°C at a speed of 150 rpm. The solid media were kept in incubation at a temperature of 30°C for 7 days. While visualizing halos indicative of dye degradation proved challenging in solid medium due to the rapid growth and intense pigmentation of the fungus, discernible halos were observed at a concentration of 10 mg/L. In both solid and liquid media, substantial decolorization was achieved at concentrations of 10 and 50 mg/L, with diminished activity observed at 100 mg/L, suggesting a better analysis of adsorption by the Langmuir and Freundlich isotherms, which the biosorption process applies better in the Langmuir model. Finally, the enzymatic activity analysis of the laccase enzyme was carried out with the purpose of verifying the potential of this enzyme. However, there was low dye degradation from the enzymatic activity, meaning that the performance from laccase was unable to oxidize Congo Red in the concentrations higher than 10 mg/L.

Keyword: biodegradations; synthetic dyes; bioremediation; degradation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	12
2.1 – Objetivo geral.....	12
2.2 – Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 – Indústrias Têxteis.....	13
3.2 – Azocorantes.....	13
3.2.1 – Vermelho Congo.....	14
3.3 – TRATAMENTO DE EFLUENTE TÊXTEIS.....	15
3.3.1 – Adsorção.....	16
3.3.2 – Tratamento biológico.....	17
3.3.3 – Tratamento por fungos.....	18
3.3.4 – Biossorção.....	18
3.3.5 – Biodegração.....	18
3.4 – BIORREMEDIAÇÃO.....	19
3.5 – FUNGO <i>P. oryzae</i>.....	20
3.6 – ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS NA BIORREMEDIAÇÃO.....	21
3.6.1 – Enzima Lacase.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 – Cultivo do fungo.....	24
4.2 – Azocorante.....	24
4.3 – Meios de cultura.....	24
4.4 – Análise espectrofotométrica UV-VIS.....	25
4.4.1 – Descoloração por biodegradação.....	25
4.4.2 – Processos biossortivos.....	25
4.5 – Análise enzimática.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 – Cultivo do fungo em placas e tubos de ensaio.....	28
5.2 – Análise de absorbância TECAN.....	30
5.3 – Isotermas de adsorção.....	32
5.4 – Análise enzimática.....	35
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos são muito utilizados em indústrias químicas, têxteis e farmacêuticas. Devido ao aumento dessas indústrias ocorreu também o aumento da poluição no meio ambiente, principalmente da água e do solo. Esse fator possui efeitos prejudiciais para a saúde dos seres humanos, plantas, animais e micro-organismos. As indústrias têxteis, são consideradas as mais poluentes em relação a água e solo, por fazerem uso de mais de 8000 tipos de químicos para sua produção, gerando um gasto muito grande de água (SARAVAN *et al.*, 2016).

A contaminação dos efluentes e dos solos com o descarte inadequado de resíduos e o não tratamento dos mesmos causa alteração na qualidade da água e geram rejeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, visto que muitos contaminantes químicos só possuem efeito depois de um longo período de exposição, como flúor, chumbo e nitrato (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Ademais, este problema produz riscos à cadeia de produção e ao meio ambiente, como a diminuição da produção agrícola e a contaminação dos lençóis freáticos (SANTOS *et al.*, 2016).

Corantes sintéticos de tipo azo, conhecidos como azocorantes, são os mais utilizados nesse tipo de indústria, sendo tóxicos e altamente resistentes à degradação devido sua complexa estrutura química (LU *et al.*, 2009). Sendo assim, a busca por alternativas capazes de degradar esses corantes de forma eficaz continua avançando, considerando que atualmente uma das mais utilizadas é a biorremediação. Esse processo utiliza micro-organismos para remover ou neutralizar, por um processo metabólico em um ambiente poluído, a degradação, mineralização, transformação ou a diminuição da concentração de um poluente muito tóxico em menos tóxico (ADAMS *et al.*, 2015).

Essa estratégia tem a capacidade de utilizar micro-organismos para degradar substâncias nocivas sem contaminar um meio com o outro, sendo de menor custo e por possuir maior reprodutibilidade laboratorial comparado a outras formas de remediação (MALLMANN, V., 2019). No entanto, por ser um método que ainda está em evolução no Brasil (AMARAL; LACERDA; NAVONI,

2020) a biorremediação necessita de um entendimento melhor entre a ação que os micro-organismos possuem em relação aos resíduos que passam por esse processo, pois muitos fatores ambientais (físicos, químicos e biológicos) influenciam na capacidade desses micro-organismos em biodegradar moléculas (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

O tratamento de corantes sintéticos por biorremediação torna compostos nocivos em inofensivos sem a utilização de compostos químicos, como é o caso do corante de grupo azo Vermelho Congo, o qual é um dos corantes escolhidos para passar pelo processo de biodegradação atualmente por ser muito utilizado na indústria têxtil e estar entre os mais tóxicos por possuir aminas em sua composição, sendo cancerígeno e mutagênico e pela sua permanência prolongada no meio ambiente (TAPALAD *et al.*, 2008). Esse grupo perde entre 10-20% de sua massa nos processos de coloração de tecidos, levando a riscos a efluentes devido ao descarte sem tratamento prévio (PINHEIRO, M. A. M., 2018).

Assim, o uso de fungos para degradação destes compostos se provou muito eficiente devido ao metabolismo, a atividade enzimática e as células ligninolíticas dos micro-organismos utilizados (AHMAD *et al.*, 2015). As enzimas são moléculas orgânicas produzidas por fungos, bactérias, algas e plantas que possuem o papel de biocatalisadores dos contaminantes (LACERDA, E. M., 2021). Além de oxidar a lignina, as enzimas lignolíticas podem oxidar outros compostos aromáticos que são aplicados a degradação de poluentes como os corantes têxteis (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

Dentre os diversos fungos utilizados para biorremediação, um fungo com grande potencial para degradação de moléculas de corantes é a *P. oryzae*, o qual é muito conhecido na área da agricultura, por ser causador da doença da brusone nas culturas do arroz, cevada, trigo, aveia e tritcale. Este fungo possui potencial, ainda desconhecido devido ao pouco estudo no uso para biorremediar corantes para a mitigação da poluição do meio ambiente, como aquático e terrestre.

2. OBJETIVO

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a capacidade de descoloração e biodegradação do azocorante sintético Vermelho Congo por culturas e extratos enzimáticos do fungo lignocelulolítico *P. oryzae*.

2.2 – Objetivos específicos

- Testar a influência do corante Vermelho Congo sob a atividade enzimática da *P. oryzae*.
- Avaliar a eficiência da degradação do azocorante por meios de cultura diferentes e em concentrações divergentes utilizadas para cada teste.
- Verificar a remoção da cor do corante nas análises utilizadas através de espectrofotometria de UV.
- Analisar a eficácia da remoção do corante por meio de ensaios de adsorção por isothermas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – INDÚSTRIAS TÊXTEIS

As indústrias têxteis têm crescido muito nos últimos anos e desempenham um papel crucial na economia de vários países, incluindo o Brasil. O segmento têxtil destaca-se significativamente, uma vez que seu extenso parque industrial gera consideráveis volumes de efluentes. Quando inadequadamente tratados, esses resíduos podem ocasionar sérios problemas de contaminação ambiental (KUNZ *et al.*, 2002). Ademais, a indústria têxtil é reconhecida como uma das principais fontes de poluição da água. Isso ocorre devido ao amplo uso de grandes volumes de água ao longo da sua produção, desde as etapas de tingimento e acabamento até a dissolução de corantes e produtos químicos (MARÍN, S. L. A., 2015).

As atividades industriais, ao empregarem uma ampla gama de corantes, resultam na produção significativa de resíduos orgânicos que são liberados no ambiente, junto com outros efluentes. Isso aumenta consideravelmente o perigo de contaminação do solo e das águas presentes nos corpos d'água naturais (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A contaminação dos efluentes naturais por esses compostos não apenas resulta em poluição visual, mas também causa perturbações nos ciclos biológicos, impactando especialmente os processos de fotossíntese, alterando a qualidade da água e gerando subprodutos carcinogênicos e mutagênicos (KUNZ *et al.*, 2002; WHO, 2019). Isso ocorre em certas classes de corantes, especialmente na classe dos azocorantes, os quais são extremamente tóxicos e resistentes devido a sua estrutura química (LU *et al.*, 2019).

3.2 – AZOCORANTES

Os azocorantes compõem um dos maiores grupos de corantes aromáticos e sintéticos e são os mais comuns a serem descartados no meio ambiente. Esses corantes são muito utilizados na indústria têxtil, farmacêutica, papel, comida, couro e de cosméticos (SARATALE *et al.*, 2011; SUDHA *et al.*, 2014). Aproximadamente 70% dos corantes sintéticos consumidos globalmente pertencem à categoria azo, nos quais possuem uma diversidade na estrutura e

variação na posição de suas moléculas (SARATALE *et al.*, 2011; ZANONI; YAMANAKA, 2016)

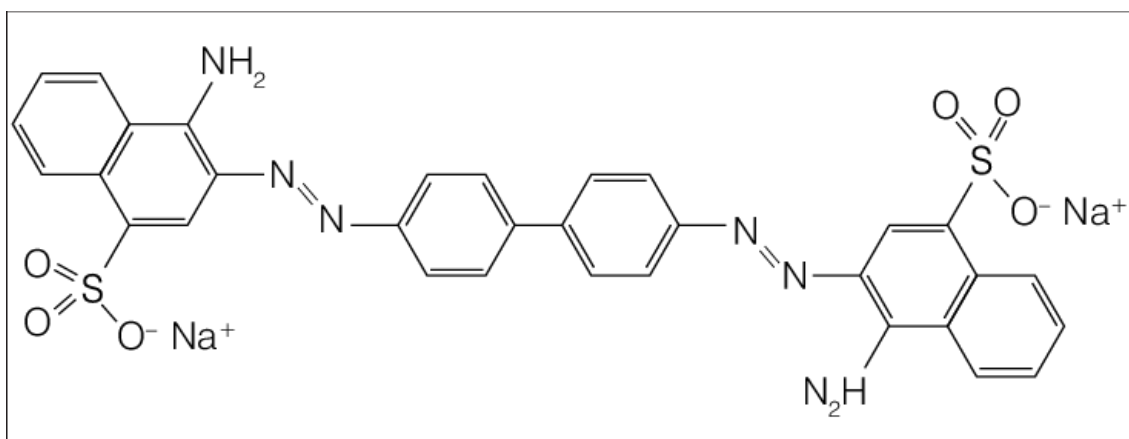
O seu descarte inapropriado faz com que contamine os efluentes e os metabólitos desses corantes que estão presentes no efluente contaminado, tem uma ação direta na redução da penetração da luz solar, assim diminuindo as atividades de fotossíntese e a concentração de oxigênio presente na água e a sua qualidade, igualmente como ocorrem efeitos tóxicos com a flora e fauna aquática (SARATALE *et al.*, 2011). Ademais, muitos estudos indicam que os corantes sintéticos possuem efeitos tóxicos na germinação e na biomassa de várias plantas que são importantes para o funcionamento do ecossistema. (SARATALE *et al.*, 2011).

Estes corantes são insolúveis em água e são produzidos diretamente na fibra durante o processo de tingimento do tecido. Nesse procedimento, a fibra absorve um composto solúvel em água conhecido como agente de acoplamento (naftol), que possui afinidade pela celulose. Esse método de aplicação direta do corante na fibra, combinando um corante precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, resulta em uma fixação elevada e resistência significativa contra a luz e umidade (PINHEIRO, M. A. M., 2018).

3.2.1 – Vermelho Congo

Conforme descrito por Afhami e Moosavi (2009), o Vermelho Congo (VC) é um corante aniônico com uma estrutura molecular bastante complexa que inclui anéis aromáticos, dificultando assim a sua degradação química. É um corante de sal sódico do ácido benzidinodiazó-bis-1naftilamina-4-sulfônico, cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, com massa molar é $696,66g.mol^{-1}$, sendo classificado como diazo secundário devido aos dois grupos de ligações azo estáveis (-N=N-) (ARIM, A. L. 2014).

Fig. 1: Estrutura química do corante Vermelho Congo.



Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2010.

Devido a sua complexa estrutura aromática, alta estabilidade físico-química, térmica e óptica, se torna difícil a sua degradação e seu subproduto em condições de degradação pode formar aminas cancerígenas como a benzidina, substâncias tóxicas para animais aquáticos e plantas que podem se acumular nos sedimentos das estações de tratamento de efluentes, ademais por ter uma grande afinidade com fibras de celulose (AFKHAMI; MOOSAVI, 2009; SPONZA; ISIK., 2005). Portanto, devido à sua elevada toxicidade, a indústria de celulose, que inclui o algodão têxtil e papel, tem progressivamente abandonado o uso desse material (REIS, L. G. T., 2009).

3.3 – TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Os corantes utilizados na indústria possuem estabilidade à luz solar, resistência à temperatura e a ataques de micro-organismos, o que torna difícil a aplicação de tratamentos de efluentes corados em estações de tratamento convencionais que utilizam processos biológicos (WESENBERG *et al.*, 2003). No entanto, a degradação de alguns corantes pode ocorrer em condições anaeróbias via oxidação e redução, como no caso dos corantes azo, processo que resulta na formação de aminas aromáticas (GOLKA; OPPPS; MYSLAK, 2004; WESENBERG *et al.*, 2003).

De acordo com Guaratini e Zanoni (2000), nas práticas atuais as principais tecnologias empregadas para a remoção da cor de efluentes têxteis são fundamentadas em processos físico-químicos e biológico. A liberação não

regulada desses resíduos, em concentrações variadas, impacta na absorção de luz pelos seres vivos e animais presentes no ambiente aquático. Além disso, contribui para a contaminação dos mananciais e da água fornecida à população.

Vários métodos para remoção de corantes em efluentes estão sendo utilizados, porém a implementação de métodos físico-químicos possui suas desvantagens econômicas por necessitarem de mais energia e produtos químicos, fazendo com que sejam não tão eficientes em remover completamente os azocorantes recalcitrantes e seus derivados orgânicos, gerando uma quantidade significativa de lodo que pode causar problemas de poluição secundária. No entanto, o uso de micro-organismo e enzimas para a descoloração e degradação são uma alternativa melhor, comparada com os métodos físico-químicos, pois reduz no gasto de água para o tratamento (SARATALE *et al.*, 2011).

Portanto, devido à extrema complexidade e diversidade dos compostos encontrados nos efluentes, surge a grande preocupação constante em desenvolver processos direcionados para que ocorra um tratamento mais adequado para a retirada e diminuição desses compostos nocivos no meio ambiente.

3.3.1 – Adsorção

A adsorção é uma opção no âmbito do tratamento físico-químico, que visa a remoção de compostos químicos orgânicos e inorgânicos não eliminados pelos métodos convencionais (XU *et al.*, 2022), assim a adsorção é o fenômeno de concentração de uma substância na superfície de um sólido ou líquido. Nesse processo, a substância que retém outra em sua superfície é denominada adsorvente, enquanto aquela que é atraída para essa superfície é chamada de adsorvato (MARÍN, S. L. A., 2015).

É uma técnica na qual uma substância nociva (gasosa, sólida ou líquida), se liga com a superfície externa do material adsorvente, fazendo com que quanto mais extensa for essa superfície em relação a unidade de massa sólida, mais favorável se tornará à adsorção (NASCIMENTO *et al.*, 2014), assim fazendo com que uma grande área de superfície específica absorva e separe os

poluentes da água que está sendo tratada por adsorção física ou química (XU *et al.*, 2022).

O processo de adsorção pode ser categorizado em fisissorção (adsorção física) e quimissorção (adsorção química). A fisissorção ocorre quando as interações entre adsorbato e adsorvente são relativamente fracas, como a força de Van der Waals, ocorrendo também a sobreposição de camadas de adsorbato sobre a superfície do sólido. Já na quimissorção, há formação de ligações iônicas e covalentes, sendo mais intensas quando comparadas com as interações de fisissorção (ANTUNES *et al.*, 2018).

Para avaliar a interação entre o adsorvente e o adsorbato, os modelos mais utilizados para cálculos são os de Langmuir (1918) e Freundlich (1906). Nas isotermas de Langmuir, a adsorção ocorre apenas na superfície do adsorvente por meio da interação de sítios específicos formando monocamadas e nas isotermas de Freundlich, essa superfície acaba formando múltiplas camadas (HEYLMANN, K. K. A., 2015).

Sendo assim, a adsorção visa aprimorar a qualidade do efluente destinado à liberação em corpos hídricos (XU *et al.*, 2022), se destacando como a mais empregada devido ao seu custo acessível, altamente eficaz (principalmente na remoção de corantes de meio aquosos), exigência de espaço reduzido para implantação e operação simplificada (CHOY *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2022).

3.3.2 – Tratamento biológico

Segundo Carvalho *et al.* (2021), o tratamento biológico pode ser dividido em aeróbio e anaeróbio, sendo o aeróbio um processo mais rápido, sensível, mas com alta eficiência de remoção de nutrientes que permite um processo de tratamento menos rigoroso. Já o tratamento anaeróbio, é eficiente na remoção da matéria orgânica, produz menos lodo, necessita de menos energia para o processo e possui a possibilidade de produzir biogás, o qual é usado para a produção de energia.

O processo mais utilizado é o de lodos ativados, os quais fazem a agitação dos efluentes com presença de micro-organismos e ar, para que ocorra a metabolização e floculação de uma grande parte da matéria orgânica. No

entanto, esse processo é bastante susceptível a composição do efluente e acaba produzindo um grande volume de lodo. Isso se torna um problema devido ao teor elevado de corante adsorvido fazendo com que esse lodo não possa ser reaproveitado (KUNZ *et al.*, 2002).

3.3.3 – Tratamento por fungos

A habilidade dos fungos para adaptar seu metabolismo varia entre fontes de carbono e nitrogênio, os quais são importantes para sua sobrevivência. Assim, os fungos produzem uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares que são capazes de degradar muitas moléculas complexas. O sistema desses micro-organismos é muito apropriado para o tratamento de efluentes contaminados com corantes e até mesmo metais pesados. Os fungos possuem a habilidade de degradar esses tipos de poluentes devido as suas enzimas lignolíticas, como lignina peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) e a lacase (SARATALE *et al.*, 2011).

3.3.4 – Biossorção

Esse tratamento se dá a ligação do soluto a biomassa através de um processo que não envolve energia metabólica, sendo de baixo custo operacional e com capacidade de desintoxicar grandes volumes de efluentes (BARROS; CARVALHO; RIBEIRO, 2017). É um processo de adsorção com retenção, remoção ou recuperação dos contaminantes de uma solução, ou seja, é a capacidade que a biomassa possui em adsorver poluentes em uma superfície através de grupos funcionais carboxílicos e fenólicos, nos quais a carga negativa possui a capacidade de remover os cátions em solução por meio de vários processos, como a complexação, troca-iônica e a adsorção (LIMA, S. N. P., 2017).

3.3.5 – Biodegradação

Este processo utiliza de microrganismos para converter moléculas mais complexas em substâncias mais simples, ou seja, a estrutura original de uma molécula é destruída e o poluente é dividido em fragmentos pelas células microbianas, assim convertendo os compostos xenobióticos em bioprodutos como carbono, água e em alguns compostos inorgânicos (ALI, H. 2010).

Vários micro-organismos, como fungos, bactérias, leveduras e algas são utilizados para biodegradar corantes sintéticos, possui uma capacidade enorme de degradar esses compostos. A sua eficácia depende muito da adaptação e atividade do micro-organismo escolhido para fazer o processo (ALI, H. 2010). A atividade metabólica de micro-organismos como os fungos, resulta na produção de conjuntos intra e extracelulares de enzimas capazes de degradar poluentes orgânicos complexos, como resíduos orgânicos, hidrocarbonetos poliaromáticos e efluentes contendo corantes (SARATALE *et al.*, 2011).

Assim, os fungos possuem a capacidade de degradar e até mineralizar diversas espécies recalcitrantes, devido à presença de um sistema lignolítico extracelular com baixa especificidade (SOLÍS *et al.*, 2012), sendo os fungos de podridão branca considerados os que desempenham o papel de eficiência maior entre os outros tipos de fungos utilizados para esse processo devido a capacidade de produzir várias oxidoredutases para degradar a lignina e compostos aromáticos relacionados. Ademais, são capazes de mineralizar poluentes orgânicos persistentes no efluente tratado (ALI, H., 2010).

3.4 – BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma técnica desenvolvida por vários gêneros de micro-organismos eucariontes e procariontes, os quais possuem técnicas para biodegradar, desintoxicar ou biotransformar substâncias contaminadas, utilizando um organismo vivo e natural para ajudar neste processo, sendo um processo que utiliza os produtos de micro-organismos para remover contaminantes nocivos (ADAMS *et al.*, 2015; MALLMANN, 2019). Este processo tem como o objetivo de degradar substâncias contaminantes no solo, utilizando enzimas que promovem o metabolismo para o crescimento desses micro-organismos, assim removendo, reduzindo ou erradicando as concentrações de compostos químicos no ambiente e tornando-os menos tóxicos (ADAMS *et al.*, 2015; LEONEL *et al.*, 2010).

Os processos biológicos utilizados na biorremediação dependem do tipo de tratamento escolhido, como *in-situ*, o qual é realizado no local contaminado ou *ex-situ*, o qual é realizado fora do local (TOMASSONI *et al.*, 2014). Além da

escolha do tipo de tratamento, a seleção da técnica mais apropriada é crucial. Portanto, existem sistemas de tratamento muito utilizados como fitorremediação, biopilhas, bioventilação, landfarming, bioestimulação e a bioaugmentação, sendo os dois últimos os mais utilizados (ADAMS *et al.*, 2015; LEONEL *et al.*, 2010; TOMASSONI *et al.*, 2014).

Essas técnicas demonstram uma viabilidade econômica superior devido aos seus custos reduzidos, em comparação com os métodos tradicionais. Além disso, são mais sustentáveis e contribuem para a minimização do contato com os contaminantes (MALLMANN, V., 2019). De acordo com Leonel *et al.* (2010), o ótimo funcionamento desses processos depende das condições do próprio ambiente, como características físico-químicas, disponibilidade de nutrientes, umidade, pH, temperatura, concentração e toxicidade do contaminante e características geológicas e hidrológicas do local.

3.5 – FUNGO *P. oryzae*

Dentre os diversos fungos utilizados para biorremediação, um fungo com grande potencial para degradação de moléculas de corantes é a *P. oryzae*, o qual é muito conhecido na área da agricultura, por ser causador da doença da Brusone nas culturas do arroz, cevada, trigo, aveia e triticale. Atualmente, a Brusone é considerada como uma doença de difícil controle, pois é um grande problema na produção agrícola devido a sua alta resistência a fungicidas, sendo altamente influenciada pela região e suas condições climáticas, assim causando prejuízos para a produção dessas culturas (GOULART; SOUSA; URASHIMA, 2007).

A *P. oryzae* é um patógeno policíclico que em condição laboratorial pode produzir de 2.000 a 6.000 conídios em uma média de 14 dias (URASHIMA; LEITE; GALBIERI, 2007) e sua resistência a fungicidas se dá ao desconhecimento de aspectos importantes da biologia do patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2015). No entanto, este fungo não foi muito estudado no campo da biorremediação, mesmo possuindo grande potencial devido ao seu crescimento rápido, a capacidade de viver em condições complexas e por possuir enzimas

oxidativas, como as enzimas ligninolíticas, que ajudam na degradação das moléculas de corantes (NGO, A. C. R.; TISCHLER, D., 2022).

3.6 – ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS NA BIORREMEDIAÇÃO

As enzimas são moléculas orgânicas complexas que são produzidas por micro-organismos, como bactérias, fungos, algas e até mesmo plantas, atuando como biocatalizadores dos contaminantes, assim fazendo o processo de biodegradação de compostos tóxicos (LACERDA, E. M., 2021), no entanto é um processo lento com a diminuição da viabilidade da biorremediação em sua prática (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

As principais enzimas que possuem a capacidade de degradar lignina são a enzima lacase, manganese peroxidase (MnP), e lignina peroxidase (LiP), essas são conhecidas também por deslignificar diferentes substratos, como papel, comida de animais e biocombustíveis e além da deslignificação, são utilizadas como fatores de desintoxicação reduzindo substâncias tóxicas na biomassa tratada nos processos de biorremediação (PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015).

3.6.1 – Enzima lacase

A enzima lacase é uma das principais utilizadas para degradação de azocorantes, as quais são enzimas oxidases multicobre que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, reduzindo uma molécula de oxigênio molecular (encontrado no ambiente) a água, sendo o subproduto final da reação (LASSOUANE *et al.*, 2019; LOPEZ-BARBOSA *et al.*, 2020), assim como degradar diversas estruturas químicas, como a lignina polimérica e substâncias húmicas que resultam diferentes fenóis para servirem de nutrientes e fonte de alimento para os micro-organismos (NUNES; KUNAMNENI, 2018).

Devido à sua capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as lacases fúngicas vem sendo aplicadas em várias áreas dos campos industriais, como deslignificação, síntese de produtos químicos medicinais, remediação de solos e águas contaminadas, modificação

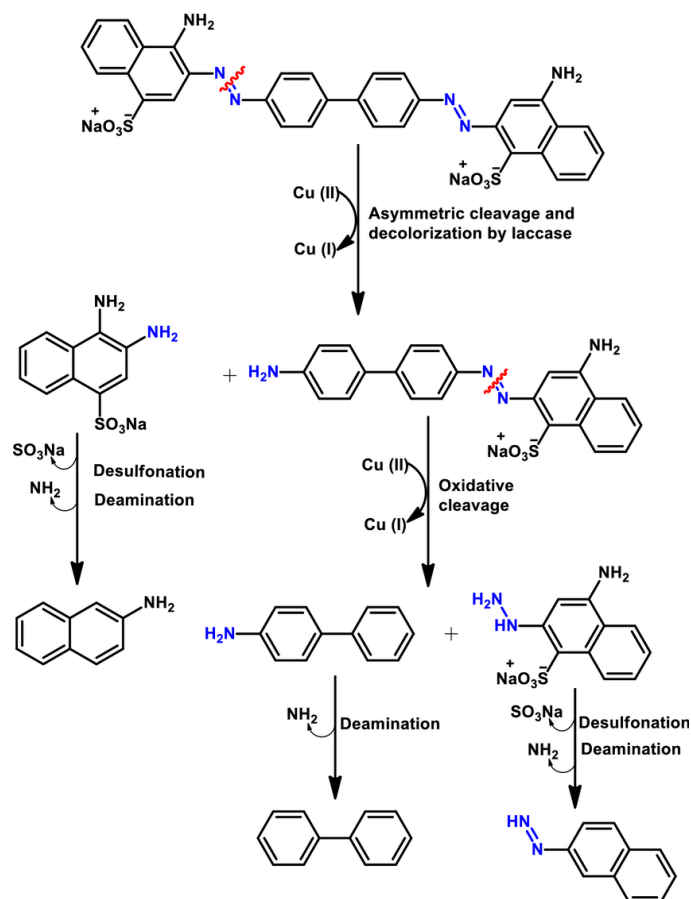
de fibras de madeira, clareamento de corantes, e produção de etanol (MINUSSI *et al.*, 2002; MAYER; STAPLES, 2002).

Uma das características fundamentais da lacase, é que seu potencial redox (E°) tem relação direta com a energia necessária para remover um elétron do substrato redutor, além disso, as lacases fúngicas com grande potencial redox são capazes de oxidar substratos com alto E° (SHLEEV *et al.*, 2004), sendo muito utilizadas na degradação de muitos poluentes persistentes no meio ambiente, principalmente fungos de podridão branca (MAYER, A. M.; STAPLES, R. C., 2002).

Em sua estrutura, os átomos de cobre presentes na molécula podem ser classificados como Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3 (T1, T2 e T3), os quais estão divididos em diferentes locais de ligação. Cada um possui uma função em todo processo enzimático, sendo o T1 responsável pela oxidação do substrato e por transmitir a cor azul à enzima. Ocorre também a transferência de elétrons do T1 para o T2 e T3, levando a redução de oxigênio molecular (DURÁN; ROSA, 2002; JÚNIOR, J. C. S. S., 2019).

Essa enzima possui a capacidade de degradar azocorantes sem clivagem direta das ligações azo através de um mecanismo de radical livre não específico, evitando a formação de aminas aromáticas tóxicas (SATISH *et al.*, 2009). A oxidação da lacase desintoxica os azocorantes devido a sua reação de liberação de ligações azo sob a forma de nitrogênio molecular (FORGIARINI, E., 2006).

Fig. 2: Ação de degradação da enzima lacase sobre o corante Vermelho Congo



Fonte: GOUD, B. S. *et al.*, 2020.

A ação direta da lacase sobre o corante Vermelho Congo (figura 2) catalisa a degradação pela clivagem assimétrica da ligação azo de $-N=N-$ que é seguida por clivagem oxidativa, dessulfonação, desaminação e desidroxilação. Algumas lacases foram identificadas com a capacidade de degradar compostos sem quebrar a ligação azo, fazendo com que ocorra a formação de outros compostos fenólicos através do mecanismo de radicais livres, os quais são altamente inespecíficos (GOUD, B. S., 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – CULTIVO DO FUNGO

O cultivo do fungo *P. oryzae* foi realizado a partir do isolamento em meio de cultura BDA (Batata + Dextrose + Ágar), sendo eles em meio líquido e meio sólido. As placas foram incubadas a uma temperatura de 30°C por um período de 7 dias, em ambiente com presença de luz, até o fungo crescer e formar colônias visíveis. O fungo foi fornecido pelo Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), da Faculdade Federal de São Carlos, campus Araras.

4.2 – AZOCORANTE

Para esta etapa foi utilizado o corante azo Vermelho Congo (VC), o qual foi adicionado ao meio de cultura BDA em quantidades de 10, 50 e 100 mg/L para cada análise de diluição (CHATTERJEE *et al.*, 2020; SILVA, 2015; SINGH; DWIVEDI, 2020). Dessa forma, foi testada a influência do corante VC sob a atividade enzimática da *P. oryzae* e sua descoloração. Esses testes foram feitos em meio líquido e sólido com a presença das diferentes concentrações de corante, sendo este adicionado ao meio de cultura antes de ser autoclavado.

4.3 – MEIOS DE CULTURA

Para o meio líquido foram utilizados tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (Batata + Dextrose + Ágar) e com concentrações diferentes de corante, como 10, 50, 100 mg/L em cada ensaio. Este meio de cultura ficou em condições de agitação de 150 rpm em 30°C por 7 dias em um *shaker*, para permitir a interação do fungo com o corante. A descoloração do corante durante o crescimento fúngico indica a metabolização do composto quando comparada a um controle estéril.

Para o meio sólido, foram utilizadas placas com meio BDA com as mesmas concentrações utilizadas para o meio líquido. A atividade do fungo em relação ao corante foi avaliada por meio da formação de halos de descoloração ao

redor das colônias fúngicas. Após a inoculação do fungo em placas com meio de cultura incubadas a temperatura de 30°C por um período de 7 dias, foram analisadas as áreas de descoloração ao redor das colônias.

4.4 – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VIS

4.4.1 – Descoloração por biodegradação

Nesta etapa, foi analisada a biodegradação utilizando a análise espectrofotométrica para verificar a remoção da cor dos corantes no cultivo em meio líquido. Este método foi utilizado com a finalidade de analisar e quantificar a degradação do corante em solução de BDA, monitorando a degradação do corante pelo fungo.

Para isso, foram coletadas amostras de meio de cultura no fim do período de incubação. Essas amostras foram centrifugadas por 5 minutos em 3000 rpm para separar as células fúngicas do meio de cultura, e em seguida, a absorbância da solução foi medida em um espectrofotômetro. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 500nm, a fim de verificar a remoção da cor do corante comparada com o controle estéril.

4.4.2 – Processos biossorbitivos

Além da análise espectrofotométrica da biodegradação por descoloração do corante, também foram utilizadas as isotermas de Langmuir e Freundlich para medir a adsorção do corante Vermelho Congo por *P. oryzae*. As isotermas foram utilizadas para avaliar a capacidade de adsorção de um adsorvente em relação a um soluto (LIMA, L. F., 2020). No caso, foi verificada a cinética de adsorção na parede celular de *P. oryzae* para melhor compreensão do processo de remoção do soluto e a influência disso na descoloração que não ocorre por biodegradação.

A isoterma de Langmuir é utilizada para solutos que se adsorvem em uma única camada, enquanto a isoterma de Freundlich é utilizada para solutos que se adsorvem em múltiplas camadas. Para a construção das isotermas, foram coletadas amostras dos meios de cultura líquidos.

Essas amostras foram centrifugadas em 3000 rpm por 5 minutos para separar as células fúngicas do meio de cultura e, em seguida, a concentração do corante na solução foi medida em um espectrofotômetro TECAN de leitura UV. Com base nos resultados obtidos, foram construídas as isotermas de Langmuir e Freundlich para avaliar a capacidade de adsorção da parede celular de *P. oryzae* em relação ao corante Vermelho Congo.

A isoterma de Langmuir é dada pela equação:

$$q = (q_{\max} * b * C) / (1 + b * C)$$

Onde q é a quantidade de soluto adsorvido, q_{\max} é a capacidade máxima de adsorção, b é a constante de Langmuir e C é a concentração do soluto na solução.

Já a isoterma de Freundlich é dada pela equação:

$$q = K_f * C^{(1/n)}$$

Onde q é a quantidade de soluto adsorvido, K_f é a constante de Freundlich e n é o coeficiente de Freundlich.

4.5 – ANÁLISE ENZIMÁTICA

Neste método, foi utilizado meio de cultura BDA líquido com as concentrações de corante em mg/L, em tubos de ensaio contendo discos de ágar do fungo. Esses frascos foram mantidos em 30°C em 160 rpm por 7 dias em um *shaker*. Depois deste período, o micro-organismo foi filtrado com papel filtro e o meio filtrado foi colocado em uma centrífuga gelada a 4°C por 10 minutos em 8000 rpm para coletar o sobrenadante (SINGH; G., DWIVEDI, S. K., 2020.)

Logo após as amostras serem retiradas da centrífuga, foi colocado 600 microlitros do sobrenadante em um tubo de ensaio, adicionando 300 microlitros de solução tampão de acetato de sódio (pH 5,0) e 100 microlitros do reagente guaiacol. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em descanso por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas amostras em uma placa de espectrofotômetro para serem analisadas em um comprimento

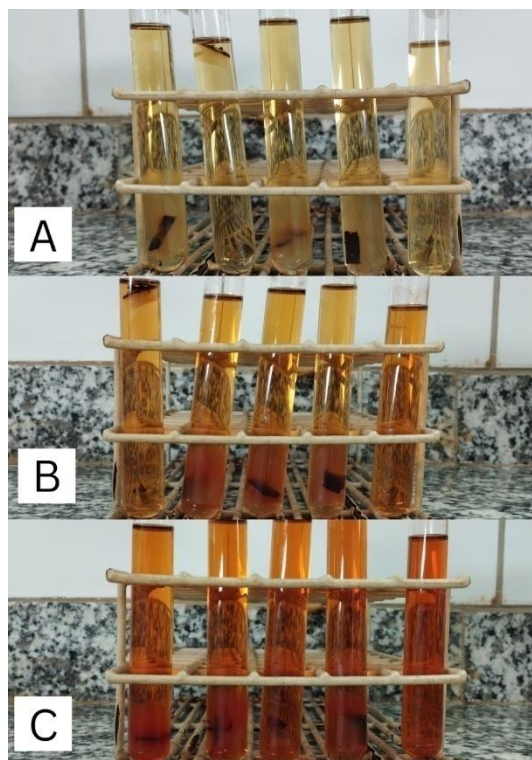
de onda de 500nm no espectro TECAN (SINGH; DWIVEDI, 2020; SUSAN, P. F. B. *et al.*, 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Cultivo do fungo nas placas e tubos de ensaio

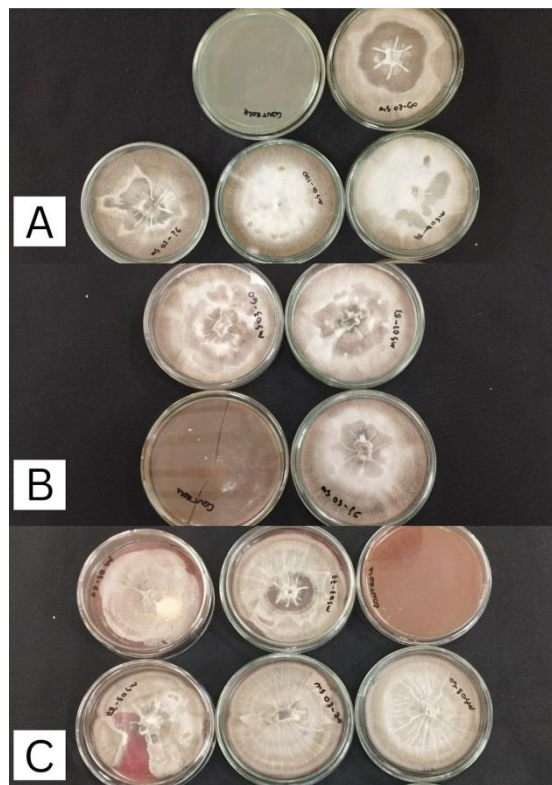
Foram utilizadas concentrações do corante na proporção de 10, 50 e 100 mg/L, assim se tornando mais eficiente as análises de meio líquido (figura 3) e sólido (figura 4) e sendo mais visível a formação de halo nos meios de cultura sólido. Essa abordagem foi baseada nos trabalhos de Charterjee *et al* (2020) e Singh & Dwivedi (2020), cujos autores utilizaram concentrações em mg/L para indicar se o fungo estaria em condições de estresse, fazendo com que o mesmo utilizasse mais enzimas para o trabalho de degradação e bioabsorção.

Fig 3: Meio de cultura líquido BDA com corante Vermelho Congo após inoculação de 7 dias com a presença do fungo *P. oryzae*, sendo o último tubo da direita o controle. (A) ensaio de biodegradação com concentração de 10 mg/L de corante. (B) ensaio de biodegradação com concentração de 50 mg/L de corante. (C) ensaio de biodegradação com concentração de 100 mg/L de corante.



Fonte: A autora, 2024.

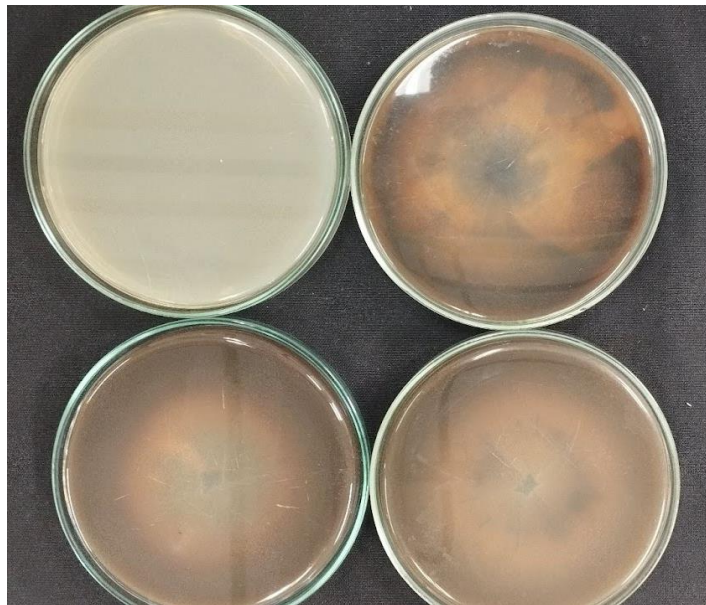
Fig 4: Meio de cultura sólido BDA com corante Vermelho Congo após inoculação de 7 dias com a presença do fungo *P. oryzae*, sendo o controle a placa sem presença de microorganismo. (A) ensaio de biodegradação com concentração de 10 mg/L de corante. (B) ensaio de biodegradação com concentração de 50 mg/L de corante. (C) ensaio de biodegradação com concentração de 100 mg/L de corante.



Fonte: A autora, 2024.

No entanto, a observação dos halos se mostrou mais eficiente nas placas com menor concentração de corante (figura 5). As placas contendo concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L se mostraram muito escuras para distinguir os halos de descoloração formados pelo fungo devido a sua forma de crescimento variado. Isso ocorre devido ao crescimento que varia de acordo com o isolado e meio de cultura que é utilizado para sua inoculação, pois a temperatura, regime de luz e meio de cultura influenciam na esporulação de *P. oryzae* (CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N., 2009).

Fig. 5: Comparação das placas com meio de cultura BDA com a presença de corante Vermelho Congo em concentração de 10 mg/L após 7 dias de incubação e a formação de halos visíveis. A primeira placa sendo a de controle, sem inoculação de fungo.

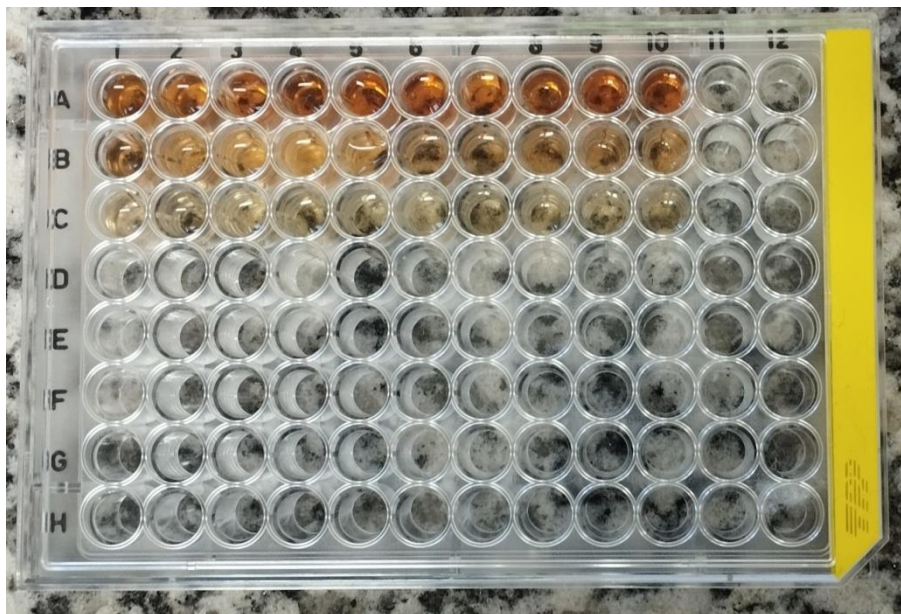


Fonte: A autora, 2024.

5.2 - Análise de absorbância TECAN (UV-VIS)

Logo após o período de incubação, as amostras foram colocadas em tubos Falcon e centrifugadas por 3 minutos em 3000 rpm para separar o sobrenadante dos resíduos gerados. O sobrenadante foi coletado dos tubos Falcon e colocado em duplicatas em uma placa de teste para espectrofotômetro (figura 6) com o auxílio de uma pipeta. A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro TECAN em um comprimento de onda de 500nm.

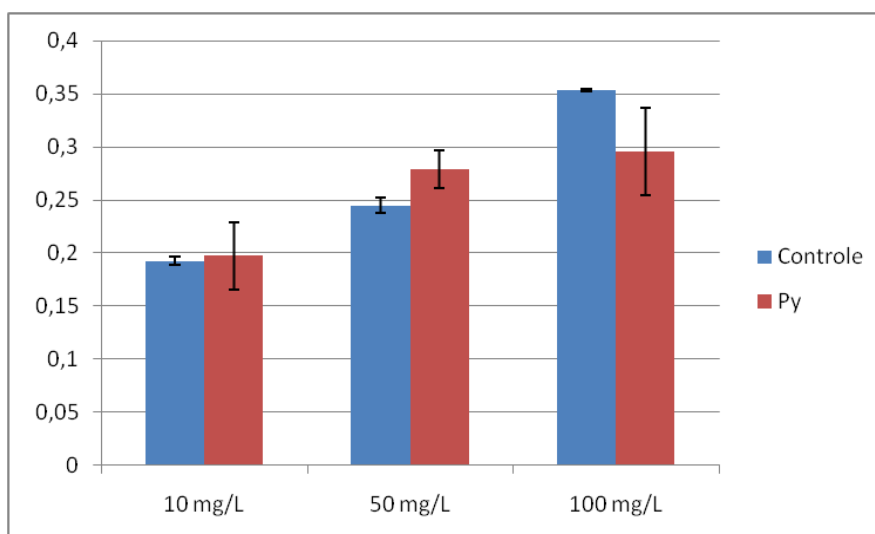
Fig. 6: Placa para medição de absorção em espectrofotômetro TECAN, com amostras do meio de cultura BDA com corante Vermelho Congo nas concentrações de 100 mg/L, 50 mg/L e 10 mg/L, após inoculação com o fungo *P. oryzae*.



Fonte: A autora, 2024.

É possível observar a diferença (figura 7) entre os ensaios em comparação com os controles, ocorrendo um aumento do valor da concentração de corante comparado ao valor da concentração do controle, o qual era somente meio de cultura BDA com a presença do corante Vermelho Congo, sem atividade fúngica. O aumento do valor ocorreu nas concentrações de 10 mg/L e 50 mg/L, porém diminuindo na concentração de 100 mg/L.

Fig. 7: Comparação dos ensaios de meio de cultura com corante e presença fúngica e controle com meio de cultura e com a presença de corante sem atividade fúngica, analisados pelo espectrofotômetro. A barra vermelha (Py) representa os ensaios e a barra azul representa os controles, na diferença de 10 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L de corante.



Fonte: A autora, 2024.

Isso pode ter ocorrido, pois fungos fitopatógenos possuem fitotoxinas que afetam o metabolismo da célula hospedeira e a sua estrutura, fazendo com que ocorra uma alteração na permeabilidade de membranas, mudança no equilíbrio iônico, perda de eletrólitos e aumento na respiração (MELO, T. A., 2013). Outro fator é a capacidade da *P. oryzae* em produzir uma toxina que induz clorose nas folhas de aveia quando manifesta os sintomas da doença do brusone em sua cultura (MELO, T. A., 2013). Isso mostra que provavelmente o fungo produziu fitotoxinas capazes de aumentar a concentração de pigmentação no meio analisado, fazendo assim, com que a concentração do pigmento tenha aumentado ao invés de diminuir.

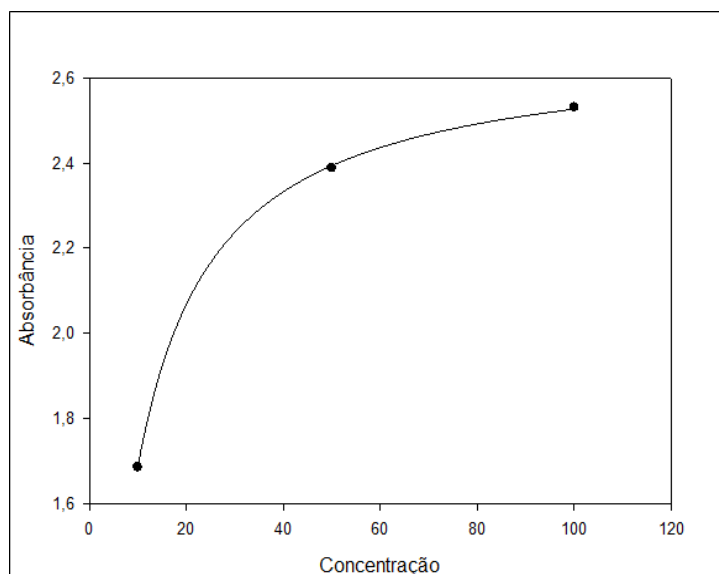
Charterjee *et al.* (2020) em seu estudo na descoloração do corante Vermelho Congo utilizando o microrganismo *Aspergillus flavus*, observou que o fungo possui uma atividade baixa de acordo com o aumento da concentração do corante, mostrando que poderia ser uma inibição do crescimento do fungo diminuindo seu desempenho. Em vista disso, o fungo *P. oryzae* se mostrou com desempenho menor a medida que ocorria o aumento da concentração do corante. Portanto, é possível afirmar que a *P. oryzae* possui uma capacidade de descolorir azocorantes, sendo mais eficiente em pequenas concentrações e mostrando certa dificuldade em grandes concentrações, podendo afetar sua desempenho na biorremediação em larga escala.

5.3 - Isotermas de adsorção

As isotermas foram obtidas através da relação entre a concentração de corante e a quantidade de corante adsorvida. No modelo de Langmuir (figura 8), quando o valor de $1/c$ é igual ou menor que 1 indica que a adsorção é linear, quanto maior o valor do $1/c$, mais forte será a interação entre o adsorvente e o adsorbato, neste caso a *P. oryzae* e o corante (DEBRASSI, A.; LARGURA, M. C. T.; RODRIGUES, C. A., 2011). Portanto, se o valor do coeficiente de determinação R^2 for maior que 1 o processo se torna desfavorável, tornando-se favorável quando os valores do coeficiente de R^2 se encontram maior que 0 e menor que 1 (SATURNINO, I. M., 2020).

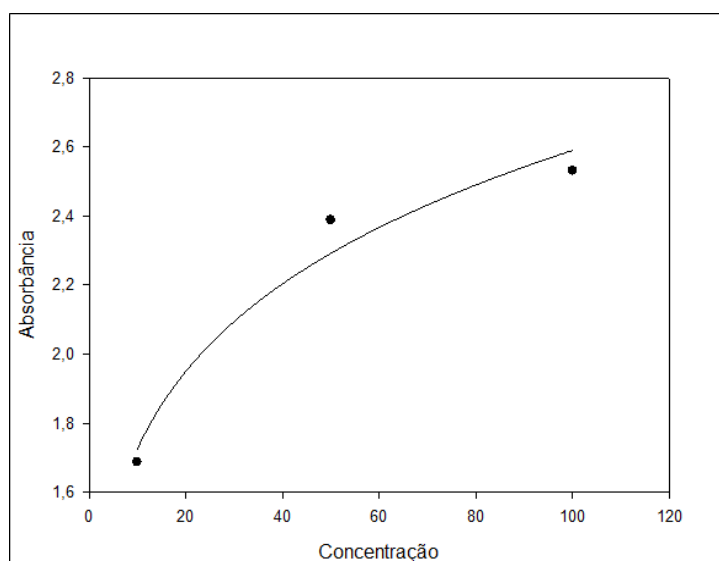
No modelo de Freundlich (figura 9), uma adsorção favorável se faz a mostra quando o valor de n fica entre 1 e 10, um valor maior que esse indica que há uma interação muito forte entre o adsorvente e adsorbato, enquanto se o valor de $1/n$ for igual a 1 indica que ocorre uma adsorção linear, na qual a adsorção é igual para todos os sítios de energia (FEBRIANTO *et al.*, 2009). Os parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas ao modelo foram descritos na tabela 1.

Fig. 8: Sorção do corante pelo fungo na isoterma de Langmuir.



Fonte: A autora, 2024.

Fig. 9: Sorção do corante pelo fungo na isoterma de Freundlich.



Fonte: A autora, 2024.

Analisando os gráficos das figuras 7 e 8, foi possível entender que o melhor modelo para representar a adsorção do corante Vermelho Congo pelo fungo *P. oryzae* foi o de Langmuir, pois ao analisar o coeficiente de determinação R^2 estabelecido, nota-se que o valor de 0,9999 respectivamente (tabela 1) indica que há um excelente ajuste dos dados experimentais mostrando que a adsorção se adequa a esse modelo. A capacidade máxima de adsorção indicada pelo q_{max} mostra que ocorreu uma alta adsorção, assim também como o valor da constante, o qual reflete uma boa afinidade de adsorção. No entanto, não se mostra extremamente forte e irreversível neste modelo.

Tabela 1: Parâmetros obtidos dos modelos de Langmuir e Freundlich para os corantes.

Isotermas	q_{max}	b	R
Langmuir	2,6745	0,1704	0,9999
	Kf	n	R
Freundlich	1,149	5,6658	0,9824

Fonte: A autora, 2024.

Ademais, a isoterma de Langmuir ocorre por adsorção em monocamada, com sítios de adsorção energeticamente equivalentes, sem obter interações entre as moléculas adsorvidas (DEBRASSI, A.; LARGURA, M. C. T.; RODRIGUES, C. A., 2011). Isso se implica em uma adsorção uniforme com formação de uma única camada de moléculas de corante na superfície adsorvente, neste caso, a parede celular do fungo.

Em contrapartida, o modelo de Freundlich sugere que a adsorção é favorável e heterogênea à medida que a concentração aumenta, possuindo um bom ajuste experimental. Essa adsorção em superfícies heterogêneas mostra uma possível formação de múltiplas camadas de adsorção. Apesar do bom ajuste do coeficiente R^2 (0,9824), o modelo de Freundlich se mostra ligeiramente inferior ao modelo de Langmuir, indicando que embora haja alguma heterogeneidade na superfície adsorvente e potencial formação de múltiplas camadas, esses fatores não se mostram serem predominantes.

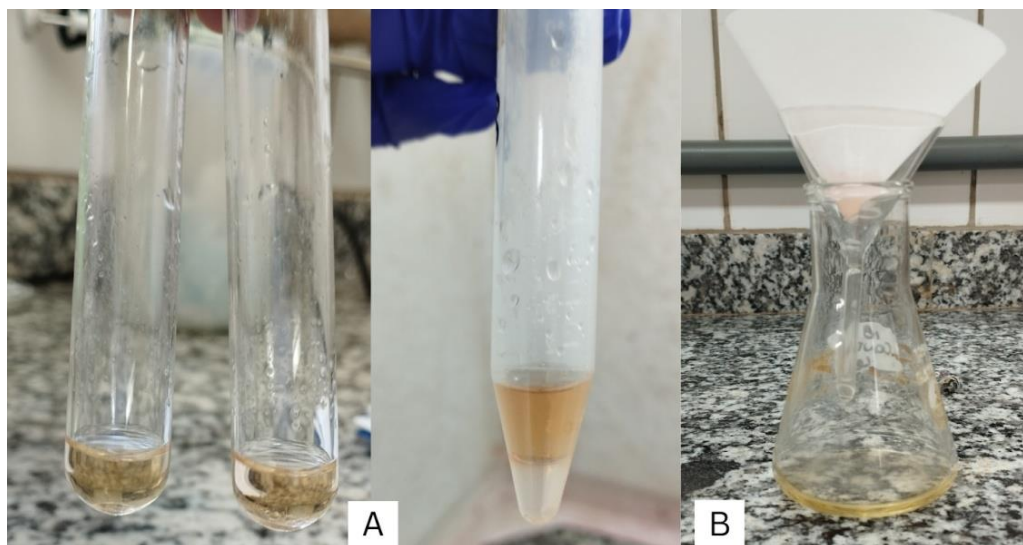
No entanto, nesta análise de isotermas é possível averiguar que o corante possui baixa afinidade com o fungo de certa maneira, pois o valor da constante de Langmuir é baixo, mostrando que o Vermelho Congo possui interações

fracas com o fungo. Contudo, os dados obtidos indicam que o modelo de Langmuir descreve melhor a adsorção do corante Vermelho Congo pelo fungo *P. oryzae*, devido ao seu coeficiente de determinação ser superior ao de Freundlich, indicando que a adsorção ocorre em uma monocamada superficial, sendo todos os sítios de adsorção energeticamente equivalentes, assim tornando essa análise favorável para o modelo utilizado neste estudo.

5.4 - Análise enzimática

Após passar pelo processo de ativação enzimática e as amostras serem deixadas em descanso por 1 hora (figura 10), as mesmas foram pipetadas em uma placa de plástico para ser feita a leitura pelo espectrofotômetro TECAN para avaliar a atividade enzimática em relação ao controle que não possui nenhum tratamento fúngico e entender se houve ação da lacase.

Fig. 10: (A) amostras depois de todo tratamento e em contato com o reagente guaiacol após 1 hora em descanso. (B) amostras sendo filtradas em papel filtro para separar a biomassa do sobrenadante.

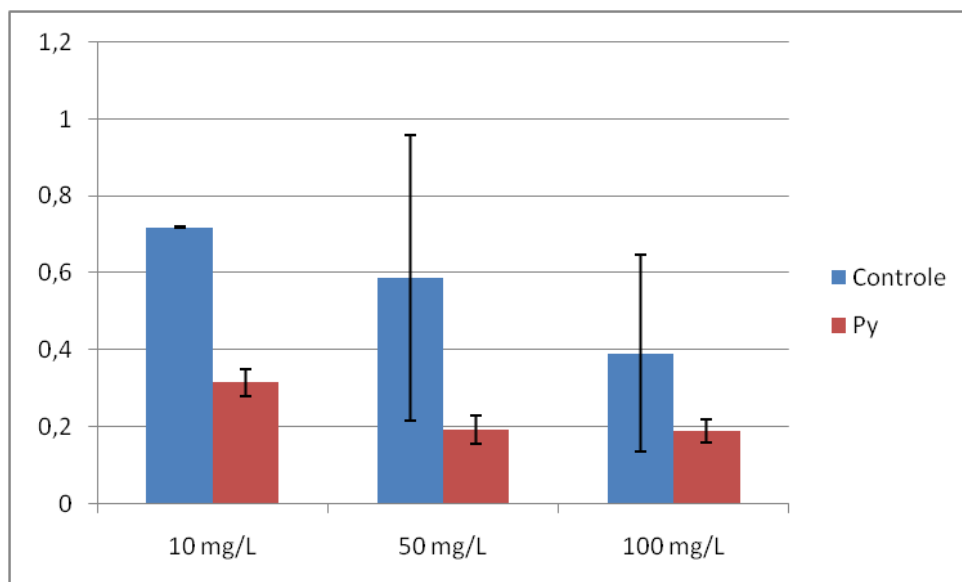


Fonte: A autora, 2024.

A figura 11 representa a relação entre o controle com os ensaios para observar a atividade enzimática da *P. oryzae*. A atividade enzimática em relação ao controle, o qual não possui presença de atividade fúngica, se mostrou baixa. Isso pode indicar que a atividade enzimática da lacase pode estar ocorrendo muito abaixo do esperado ou que não esteja ocorrendo atividade enzimática alguma. É possível observar que com o aumento da concentração ocorre a diminuição da atividade da enzima lacase. Isso mostra

que quanto maior a concentração, mais o corante vai inibir a enzima para a degradação deste azocorante sintético.

Fig. 11: Comparação dos ensaios de controle com a atividade enzimática do fungo em relação ao corante, analisados pelo espectrofotômetro. A barra vermelha (Py) representa os ensaios e a barra azul representa os controles, na diferença de 10 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L de corante.



Fonte: A autora, 2024.

Iyer & Chattoo (2003) em seu estudo sobre a purificação e caracterização da lacase do fungo *Magnaporthe grisea* (teleomorfo da *P. oryzae*), identificaram que a atividade da lacase é independente da produção da biomassa para ocorrer a atividade enzimática. Ademais, os autores relataram que a enzima quando em contato com o reagente guaiacol funciona como um doador de elétron para o reagente, ajudando na oxidação dos substratos fenólicos.

Chivukula & Renganathan (1995) em seu estudo sobre oxidação de azocorantes fenólicos pela lacase do fungo *P. oryzae*, mostra que a lacase deste fungo provavelmente não contém tirosinase e a própria lacase foi responsável pela oxidação do azocorante, obtendo também uma especificidade estreita com o substrato utilizado para essa oxidação. Neste mesmo estudo de Chivukula e Renganathan (1995), é apontado que *P. oryzae* não aparenta polimerizar os azocorantes fenólicos, porém demonstra ser totalmente capaz de oxidá-los.

Contudo, foi observado que a enzima lacase do fungo *P. oryzae* tem a capacidade de oxidar/degradar o corante Vermelho Congo em pequenas

concentrações. Por ser um fungo pouco estudado nessa área, se torna muito importante o desenvolvimento de mais estudos para testar a capacidade da enzima lacase, assim como também outras enzimas de propriedade fúngica, como, por exemplo, a protease, lipase, celulase e etc., possibilitando a aplicação da eficácia dessas enzimas em biodegradar corantes sintéticos do tipo azo em pequena e grande escala.

6. CONCLUSÃO:

O fungo *P. oryzae* se demonstrou promissor para biorremediação de azocorantes, mesmo que os melhores resultados tenham sido restritos às menores concentrações de corante. Essa conclusão é baseada nos dados modelados de descoloração e nos dados de atividade enzimática obtidos. No entanto, mais pesquisas são encorajadas para obter conhecimento aprofundado sobre este fungo em biodegradação e sorção de outros compostos tóxicos e em mais parâmetros ambientais conforme iniciados nessa pesquisa. Os estudos de métodos mais eficazes e também de diferentes concentrações de corante podem contribuir para a análise da eficácia do fungo trabalhando em condições de estresse maiores ou moderadas. Assim, como também o estudo de outras enzimas produzidas pela *P. oryzae*, além da lacase, avaliando sua interação como biodegradador de corantes.

7. REFERÊNCIAS

AFKHAMI, A.; MOOSAVI, R. Adsorptive removal of Congo red, a carcinogenic textile dye, from aqueous solutions by maghemite nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 398-404, 2010.

AHMAD, A. *et al.* Recent advances in new generation dye removal technologies: novel search for approaches to reprocess wastewater. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 30801–30818, 2015.

ALI, H. Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1–4, p. 251–273, 30 nov. 2010.

AMARAL, V.; LACERDA, F.; NAVONI, J. A biorremediação: educação em saúde e alternativas à poluição ambiental. 2020.

ANTUNES, E. C. E. S.; PEREIRA, J. E. S.; FERREIRA, R. L. S.; MEDEIROS, M. F. D.; BARROS NETO, E. L. Remoção de corante têxtil utilizando a casca do abacaxi como adsorvente natural. **Holos**, v.3, p.81-97, 2018.

ARIM, A. L. Análise da secagem de sementes de mamão formosa (*Carica papaya* L.) utilizadas na adsorção do corante vermelho do congo. 96 p. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Engenharia) – Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé, Bagé, 2014.

BARROS, D. C.; CARVALHO, G.; RIBEIRO, M. A. Processo de biossorção para remoção de metais pesados por meio de resíduos agroindustriais: uma revisão. **Revista Biotecnologia e Ciência**, Ceres, v.6, nº.1, p.1-15, 2017.

BERNAL, S. P. F. *et al.* Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: isolation, enzymatic activity and dye discoloration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, 2021.

CARNEIRO, P. A. *et al.* Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1–3, p. 694–699, fev. 2010.

CHATTERJEE, S.; DEY, S.; SARMA, M.; CHAUDHURI, P.; DAS, S. Biodegradation of Congo Red by Manglicolous Filamentous Fungus *Aspergillus flavus* JKSC-7 Isolated from Indian Sundabaran Mangrove Ecosystem. **Applied Biochemistry & Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 708, 2020.

CHIVUKULA, M; RENGANATHAN, V. Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. **Appl Environ Microbiol** **61**, 1995.

CHOY, K. K. H.; PORTER, J. F.; MCKAY, G. Langmuir, isotherms models applied to the multicomponent sorption of acid dyes from effluent onto activated carbon. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 45, p. 575–584, 2000.

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1562–156. 2009.

D'SOUZA, E.; FULKE, A. B.; MULANI, N. et al. Decolorization of Congo red mediated by marine *Alcaligenes* species isolated from Indian West coast sediments. **Environ Earth Sci**, v. 76, p. 721, 2017.

DEBRASSI, A.; LARGURA, M. C. T.; RODRIGUES, C. A. Adsorção do corante vermelho congo por derivados da o-carboximetilquitosana hidrofobicamente modificados. **Química Nova**. v. 34, n. 5, p. 764-770. 2011.

DURÁN, N.; MORAIS, S. G.; FREIRE, R. S. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere**, v. 40, p. 369-373, 2000.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'Annibale, A *et al.* Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n. 7, p. 907-931, 2002.

FEBRIANTO, J.; KOSASIH, A. N.; SUNARSO, J.; JU, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, SURYADI. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 616-645. 2009.

FORGIARINI, E. Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP). Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis**. 2006.

GARIMA, S.; DWIVEDI, S. K. Decolorization and degradation of Direct Blue-1 (Azo dye) by newly isolated fungus *Aspergillus terreus* GS28, from sludge of carpet industry. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, 2020.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência**, n. 34, 2005.

GOLKA, K.; OPPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v.151, p.203–210, 2004

GOPAL, I.; CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121-126. 2003.

GOUD, B. S., CHA, H. L., KOYYADA, G., & KIM, J. H. Augmented Biodegradation of Textile Azo Dye Effluents by Plant Endophytes: A Sustainable, Eco-Friendly Alternative. **Current Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3240–3255, 2020.

GOULART, A. C. P.; SOUSA, P. G.; URASHIMA, A. S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 358–363, dez. 2007.

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

HEYLMANN, K. K. A. Produção, caracterização e aplicação de carvão ativado de caroço de pêssigo no tratamento de efluente têxtil. 2015.

IHSANULLAH, I. et al. Bioremediation of dyes: Current status and prospects. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101680, dez. 2020.

IYER, G.; CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121–126, out. 2003.

JÚNIOR, J. C. S. S. Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais Imobilização e caracterização físico-química, **Universidade estadual do sudoeste da Bahia**, 2019.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LACERDA, E. M. C.; SANTANA, W. L. A. M. de; CARDOSO FILHO, M. S.; SANTOS, N. C. P. dos; MOREIRA, Ícaro T. A. Enzymatic processes in oil bioremediation and phytoremediation in mangrove sediments: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e526101119944, 2021.

LASSOUANE, F. *et al.* A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v. 271, n. September 2018, p. 360–367, 2019.

LEONEL, L. V. *et al.* Biorremediação do solo. **Terra Cultura**, v.26, n.51, 2010.

LIMA, L. F. Adsorção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário em biocarvão de casca de laranja. **Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p. 9, 37, 38, 42, 45 - 49, 108, 109. 2020.

LIMA, S. N. P. Caracterização das fibras de buriti e sua aplicabilidade como adsorvente de metais e corantes. **Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Tocantins**, Gurupi, 2017.

LOPEZ-BARBOSA, N. *et al.* Congo Red Decolorization Using Textile Filters and Laccase-Based Nanocomposites in Continuous Flow Bioreactors. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1227, 24 jun. 2020.

LU, L. *et al.* Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1149–1156, out. 2009.

MALLMANN, V.; ARAGÃO, L. W. R.; FERNANDES, S. S. L.; FERNANDES, T. C. L.; ARAGÃO, R. F. R.; SILVA, R. C. de L. da. As Vantagens da Biorremediação na Qualidade Ambiental. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 12–15, 2019.

MARÍN, S.L.A. Remoção dos corantes têxteis C.I. Reactive Blue 203 e C.I. Reactive Red 195 mediante o uso de bagaço de maçã como adsorvente. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

MAYER, A. M. STAPLES, R. C. Lacase: New functions for an old enzyme phytochemistry, v. 60, p. 551-565, 2002.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M. & DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n.6-7, p. 205-216, 2002.

MELO, T. A. Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. **Biblioteca de Ciências e Tecnologia**, 2014.

NGO, A. C. R.; TISCHLER, D. Microbial Degradation of Azo Dyes: Approaches and Prospects for a Hazard-Free Conversion by Microorganisms. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 8, p. 4740, 14 abr. 2022.

NUNES, C.S.; KUNAMNENI, A. Laccases—Properties and applications. **Enzym. Hum. Anim. Nutr.**, v. 4, p. 133–161, 2018.

OLIVEIRA, D. C. S.; AZEVEDO, P. G. F.; CAVALCANTI, L. A. P. Processos biológicos para o tratamento de efluentes: uma revisão integrativa. **Rev. Bras. Gest. Amb. Sustent.** v.8, n.18, p.397-415, 2021.

OLIVEIRA, S. C.; CASTROAGUDIN, V. L.; MACIEL, J. L. N.; PEREIRA, D. A. S.; CERESINI, P. C. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 298-304, 2015.

OMOKHAGBOR ADAMS, G. *et al.* Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 29 out. 2015.

PINHEIRO, M. A. M. Produção, caracterização e aplicação do extrato bruto de *L. crinitus* na descoloração in vitro do corante vermelho Congo. Maria Alice de Melo Pinheiro - Sumé - PB: [s.n], 2018.

PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. **Bioresour. Bioprocess.** v.2, n.23, 2015.

REIS, L. G. T. Degradação do corante vermelho congo em solução aquosa através de plasma obtido por eletrólise de alta tensão. **Dissertação (Mestrado em Agroquímica)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, MA.; GÜBITZ, G. M. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. **Chemosphere**, v. 58, n. 4, p. 417–422, jan. 2005.

RODRIGUES, K. *et al.*. Viabilidade do tratamento de água residuária sintética têxtil em reator aeróbio de leito fixo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 99–106, jan. 2010.

SARAVANAN, R. *et al.* Conducting PANI stimulated ZnO system for visible light photocatalytic degradation of coloured dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 1029–1033, set. 2016.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 138-157, 2011.

SATISH, K. *et al.* Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 2, p. 65-71, 2009.

SATURNINO, I. M. Estudo da adsorção no tratamento de corantes presentes em efluentes têxteis: “uma revisão sistemática das monografias da Universidade Federal do Rio Grande do Norte”. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

SHARMA, B; DANGI, A K; SHUKLA, P. Contemporary enzyme-based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–22, 2018.

SHARMA, J.; SHARMA, S.; SONI, V. Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, p. 101802, jun. 2021.

SHLEEV, S. V. *et al.* Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, V. 86, p. 9–10, 2004.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PEREZ, H. I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolourization of azo dyes: a review. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1723-1748, 2012.

SPONZA, D.T.; IŞIK, M. Toxicity and intermediates of CI Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2735-2744, 2005.

SUDHA, M.; SARANYA, A.; SELVAKUMAR, G.; SIVAKUMAR, N. Microbial degradation of Azo Dyes: **A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 670-690, 2014.

TAPALAD, T.; NERAMITTAGAPONG, A.; NERAMITTAGAPONG, S.; BOONMEE, M. Degradation of Congo red dye by ozonation. **Chiang Mai J. Sci.**, v. 35 n. 1, p. 63-68. 2008.

TOMASSONI, F. *et al.* Técnicas de biorremediação do solo. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 3, p. 46-56, 2013

VIEIRA DOS SANTOS, E. *et al.* Application of electrokinetic soil flushing to four herbicides: A comparison. **Chemosphere**, v. 153, p. 205–211, jun. 2016.

WATANABE, A. K. Descoloração do corante verde de malaquita por isolado bacteriano. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Londrina, 2021.

WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Elsevier**, p.161-187, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals. **Geneva**, 2019.

XU, L.; WU, C.; CHAI, C.; CAO, S.; BAI, X., MA; K.; JIN, X.; SHI, X.; JIN, P. Adsorption of micropollutants from wastewater using iron and nitrogen co-doped biochar: Performance, kinetics and mechanism studies. **Journal of Hazardous Materials**, v.424, 2022.